

## D-vitamin-analóg alfacalcidol hatása a regulatív T-sejt működésre nemdifferenciált collagenosisban

Zöld Éva dr. <sup>1</sup>, Szodoray Péter dr. <sup>1</sup>, Gaál János dr. <sup>2</sup>, Kappelmayer János dr. <sup>1</sup>, Csáthy László dr. <sup>1</sup>, Baráth Sándor dr. <sup>1</sup>, Gyimesi Edit dr. <sup>1</sup>, Hajas Ágota dr. <sup>1</sup>, Zeher Margit dr. <sup>1</sup>, Szegedi Gyula dr. <sup>1</sup>, Bodolay Edit dr. <sup>1</sup>

1 Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum,  
2 Kenézy Gyula Megyei Kórház és Rendelőintézet, Debrecen

A szerzők célja a természetes regulatív T-sejtek (CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3+T-sejtek; nTreg) mennyiségi meghatározása és funkcionális vizsgálata volt nemdifferenciált collagenosisban (NDC) szenvedő betegeknél, 5 hetes 0,5 µg/nap D-vitamin analóg (alfacalcidol) kezelés előtt és azt követően. Mindemellett céljuk volt a CD4+Th17+T-sejtek meghatározása, valamint a proinflammatorikus citokinek plazmaszintjének mérése.

A szerzők huszonöt D-vitamin elégtelenségben szenvedő NDC-os beteg plazmájában mérték a 25-hidroxi-D-vitamin 25(OH)D3-szintet, HPLC-technikával. Flow citometriát alkalmaztak az nTreg-sejtek és az IL-17 citokint expresszáló Th17-sejtek meghatározásához. Az interleukin (IL)-12, IFN-γ, IL-17, IL-23, IL-6 és IL-10 plazma citokin koncentrációk kimutatása ELISA-módszerrel történt.

A NDC-os betegek plazma 25(OH)D3-vitaminszintje emelkedett D-vitamin analóg adását követően (23,5±5,6 ng/ml vs. 34,5±7,4 ng/ml, p=0,059), habár az emelkedés mértéke nem volt szignifikáns. Az alfacalcidol terápiát követően mind a Th1 (IL-12 és IFN-γ), mind a Th17 (IL-17, IL-23, IL-6) citokinek szintje csökkent a NDC-os betegeknél, míg a szolubilis IL-10 szintje emelkedett (IFN-γ: 41,5±12,0 pg/ml vs. 21,7±9,9, p<0,001; IL-12: 156,7±75,2 pg/ml vs. 87,5±42,1 pg/ml, p<0,001; IL-23: 385,2±82,2 pg/ml vs. 210,0±69,3 pg/ml, p<0,001; IL-17: 37,8±9,6 pg/ml vs. 17,8±4,5 pg/ml, p=0,009; IL-6: 39,4±11,3 pg/ml vs. 23,5±6,3 pg/ml, p<0,001, IL-10: 8,4±3,0 pg/ml vs. 21,4±9,7 pg/ml, p<0,001). A D-vitamin analóg adása javította a Th17/nTreg egyensúlyzavarát a NDC-os betegeknél, azáltal, hogy gátolta a Th17-sejtek IL-17 citokintermelését és növelte az nTreg-sejtek számát. (Th17/nTreg: 0,8±0,7 vs. 0,23±0,15, p<0,005). A regulatív nTreg-sejtek funkciója hasonló volt az egészséges kontrollokéhoz, ugyanakkor a D-vitamin analóg adása javította a Treg-sejtek működését, az autológ CD4+CD25<sup>+</sup>-sejtek proliferációjára kifejtett szuppresszióját (proliferatív kapacitás D-vitamin adása előtt és után 0,638±0,1 vs. 0,415±0,15).

A D-vitamin terápia a Th1 és Th17 által termelt citokinszinteket egyaránt csökkentette, ugyanakkor elősegítette a regulatív T-sejtek működését, növelte az nTreg-sejtek számát, illetve javítja funkciójukat. NDC-os betegeknél a D-vitamin szupplementáció javíthatja a Th17/Treg egyensúlyának zavarát, ennél fogva hasznos terápia lehet a betegség kezelésében.

**KULCSSZAVAK:** D-vitamin, regulatorikus T-sejt, nemdifferenciált collagenosis

**THE EFFECT OF VITAMIN-D ANALOGUE (ALFACALCIDOL) ON THE REGULATORY T CELL FUNCTION IN UCTD**

The aim of this study was to perform a quantitative and functional analysis of natural regulatory T cells (CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3+T cells; nTreg) and CD4+Th17+T cells, and that of the plasma levels of proinflammatory cytokines in patients with UCTD before and after five weeks of 0.5 µg/day vitamin D analogue (alfacalcidol) supplementation. 25 UCTD patients with vitamin D insufficiency were enrolled in the study. Plasma levels of 25(OH)D3 were assessed by HPLC method. Flow cytometry was used for the quantification of nTreg and IL-17 expressing Th17 cells. The plasma concentrations of cytokines, interleukin (IL)-12, IFN-γ, IL-23, IL-17, IL-6 and IL-10 were measured by ELISA. Plasma 25(OH)D3 levels were elevated following vitamin D analogue treatment (23.5±5.6 ng/ml vs. 34.5±7.4 ng/ml, p=0.059), but the difference was not significant. Alfacalcidol treatment decreased both Th1 (IL-12 and IFN-γ) and Th17 related (IL-23, IL-17, IL-6) cytokine levels in UCTD patients, while the soluble IL-10 level increased (IFN-γ: 41.5±12.0 pg/ml vs. 21.7±9.9, p< 0.001; IL-12: 156.7±75.2 pg/ml vs. 87.5±42.1 pg/ml, p<0.001; IL-23: 385.2±82.2 pg/ml vs. 210.0±69.3pg/ml, p<0.001; IL-17:37.8±9.6pg/mlvs.17.8±4.5 pg/ml, p=0.009; IL-6: 39.4±11.3 pg/ml vs. 23.5±6.3 pg/ml, p<0.001, IL-10: 8.4±3.0 pg/ml vs. 21.4±9.7 pg/ml, p<0.001). The vitamin D analogue therapy improved the Th17/nTreg imbalance, because it inhibited the IL-17 expression of Th17 cells, and stimulated the number of Treg cells (Th17/nTreg: 0.8±0.7 vs. 0.23±0.15, p<0.005). The regulatory function of nTreg cells was similar to the healthy controls, however, the administration of vitamin D analogue increased the capacity of Treg cells to suppress the proliferation of autologous CD4+CD25<sup>+</sup> cells (proliferation capacity before and after vitamin D analogue: 0.638±0.1 vs. 0.415±0.15).

Our data demonstrate that a Th17/Treg functional imbalance exist in patients with UCTD. Vitamin D supplementation reduced both Th1 and Th17 related cytokine levels and at the same time, promoted the T regulatory profiles, increased the number and improved the function of nTreg cells. Our findings support the idea that the clinical application of vitamin D in patients with UCTD may influence and restore the Th17/Treg imbalance, therefore could be beneficial in the management of the disease.

**KEY-WORDS:** Vitamin D, regulatory T cells, UCTD

## Bevezetés

Nemdifferenciált collagenosis (NDC) néven jelölik a poliszisztémás autoimmun kötőszöveti betegségeket megelőző dinamikus kórállapotot. Ebben a stádiumban a poliszisztémás autoimmun betegségekre jellemző tünetek észlelhetők, a betegek szérumban autoantitestek vannak jelen, ugyanakkor a meglevő eltérések nem elegendőek ahhoz, hogy valamely definitív poliszisztémás autoimmun betegség diagnózisa felállítható legyen [1, 2, 3]. Irodalmi és saját megfigyeléseink szerint a NDC kórállapot 30–40%-ban differenciálódik bármelyik típusú definitív poliszisztémás autoimmun betegségbe, így szisztémás lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), Sjögren-szindróma (SS), kevert kötőszöveti betegség (MCTD), polymyositis/dermatomyositis (PM/DM) és szisztémás sclerosis (SSc) egyaránt kialakulhat [4, 5]. A NDC-os betegekben jelenlévő sejtmag és a citoplazma komponensek elleni antitestek, valamint a több szervi érintettség, komplex immunregulációs zavart sejtet e betegség kialakulása hátterében. Korábbi munkánkban megfigyeltük a NDC-os betegekben a Th1-sejtek IFN- $\gamma$ -túltermelését, valamint a CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3+ T-cells (természetes regulatív T-sejtek, nTreg) csökkent számát [6]. Ismert, hogy az nTreg-sejteknek fontos szerepük van az effektor T-sejtek működésének kontrollálásában, a szervezet saját szöveti károsodásának megakadályozásában, az immuntolerancia megtartásában [7].

Az utóbbi időben vált ismertté, hogy a Th1- és Th2-sejtek mellett létezik Th17-sejtcsoport, amely az IL-17 citokintermeléssel kulcsszerepet játszik a szöveti gyulladásban és az autoimmun folyamatokban [8, 9, 10]. A naív CD4+T-sejtek Th17 irányú differenciálódását humán vonatkozásban az IL-1, IL-6 és IL-23 citokinek segítik elő [11]. Megfigyelték, hogy az IL-17-termelő Th17-sejtek jelenléte összefüggésbe hozható több humán autoimmun betegséggel, így RA-eszel, sclerosis multiplex-szel (SM), SLE-szal vagy a psoriasis-szal [12–15]. Az eddigi eredmények arra utalnak, hogy a Th17- és a Treg-sejtek közötti egyensúlyi állapot alapvető az immun-tolerancia fenntartásában [16].

A D-vitamin immunmoduláló hatását az elmúlt évek kísérletes és humán vizsgálatai bizonyították. Az aktív D-vitamin gátolja a dendritikus sejtek érését és differenciálódását antigén prezentáló sejté, csökkenti az effektor T-sejtek, a B-sejtek működését, és befolyásolja az innate immunitást [17]. Mindemellett a D-vitamin direkt és indirekt úton hatással van a naív CD4+T-sejtek differenciálódására, a CD4+ T-limfociták aktivációjára, és a D-vitamin hiánya alapvető tényező lehet az autoimmun betegségek kifejlődésében [18–21].

Az aktív D-vitamin [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] csökkenti a patogén effektor CD4+T-limfociták hatását a Th1-citokinek (IFN- $\gamma$ , IL-2, és IFN- $\gamma$ ) termelésének visszaszorítása, valamint az IL-12-függő Th1-válasz csökkentése

által. A 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> analógoknak direkt hatása van a dendritikus sejtekre, így következményesen gátolják a Th1-sejtek funkcióját. A 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> emeli a regulatív T-sejtek számát és javítja funkciójukat. Az utóbbi időben vált ismertté a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Th17-sejteken kifejtett hatása, nevezetesen, hogy az aktív D-vitamin gátolja a Th17 sejtek citokintermelését és funkcióját [12, 22].

Autoimmun betegségben szenvedőknél végzett megfigyelések során, a plazma D-vitamin szintje szignifikánsan alacsonyabb volt SLE-os betegekben, I. típusú cukorbetegségben az egészséges populációhoz képest [23–25]. Összefüggést találtak az alacsony D-vitaminszint valamint az aktivitási tünetek között RA-ben. Korábbi vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a NDC-os betegek 41,6%-a D-vitamin elégtelenségben szenved (D-vitaminszint <30 ng/ml) valamint a betegek 3,1%-a D-vitaminhiányos (<10 ng/ml) [34]. Mindemellett észleltük, hogy a CD4+CD25+Foxp3+ Treg-sejtek aránya csökkent a NDC-os betegekben az egészséges populációhoz képest [6, 26].

Jelen munkánkban vizsgáltuk a NDC-os betegekben a Th17-sejtek IL-17-termelő képességét, a természetes Treg-sejtek és Th17-sejtek arányát, valamint az nTreg-sejtek funkcionális aktivitását. Keresztük a választ arra, hogy vajon egy 5 héten át tartó 0,5  $\mu$ g/nap dózisu D-vitamin analóg, alfacalcidol-kezeléssel tudjuk-e módosítani a természetes Treg-sejtek számát és funkcióját, valamint az IL-17-termelést. Mindemellett vizsgáltuk, hogy a proinflammatorikus Th1-citokinek (IL-12, IFN- $\gamma$ ), Th17-citokinek (IL-17, IL-23 és IL-6) és a kulcs regulátor szereppel bíró IL-10 citokin plazma koncentrációja hogyan változik D-vitamin kezelés hatására.

## Betegek és módszerek

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DEOEC) III. sz. Belgyógyászati Klinika Klinikai Immunológia Tanszékén kezelt és gondozott 25 NDC-os beteg (mindegyike nő) került a vizsgálatba. A vizsgálatba bevont betegek egyike sem részesült immunmoduláló terápiában, kortikoszteroid-kezelésben a vizsgálati időszakban. A vizsgálat megkezdésekor, a plazma D-vitaminszint meghatározás során, minden beteg D-vitamin-elégtelenséget mutatott (D-vitaminszintek <30 ng/ml). A NDC-t a következő, a korábban leírt kritériumtünetek alapján diagnosztizáltuk:

- definitív kötőszöveti autoimmun betegségekre jellemző klinikai tünetek és jelek jelenléte, ugyanakkor a meglevő eltérések nem elegendőek ahhoz, hogy valamely definitív poliszisztémás autoimmun betegség diagnózisa felállítható legyen;
- a betegség kezdete, illetve időtartama legalább egy év;
- legalább egy nem szervspecifikus autoantitestet lehetett kimutatni a betegek szérumban [1–3].

Minden beteg aláírta a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága által jóváhagyott beleegyező nyilatkozatot. A klinikai adatokat, beleértve az életkor, betegség fennállási ideje, a terápiára vonatkozó adatokat a beteg kórlapok, kérdőívek, illetve az intézet elektronikus adatbázisa segítségével tekintettük át.

Kontrollként 21 egészséges (átlagéletkor 55,3±7,9 év), autoimmun vagy daganatos betegségben nem szenvedő nő mintáiból végeztünk meghatározást (egészségügyi dolgozók). A betegetől és a kontrollként használt személyektől, az év azonos periódusában (júliustól szeptemberig) gyűjtöttünk szérum-, illetve plazmamintákat. A citokin és autoantitest meghatározásra összegyűjtött mintákat a feldolgozásig -70 °C-on tároltuk.

A D-vitamin-terápiát a következőképpen alkalmaztuk: minden beteg 0,5 µg alfacalcidolt kapott naponta, 5 héten át.

Minden NDC-os betegek esetében plazma 25(OH)D3 vitamin, citokinszint (IL-12, IFN-γ, IL-23, IL-17, IL-6, IL-10) meghatározás, valamint a természetes Treg-sejtek számának és funkciójának meghatározása történt. Mindemellett az IL-17-termelő CD4+T-sejtek számát és funkcióját is vizsgáltuk.

A vizsgálatba bevont betegek és kontrollok mindegyikénél ellenőriztük a kalcium homeosztázisában szerepet játszó faktorokat (parathormon, szérum kalcium), amelyek kóros eltérést nem mutattak. A NDC-os betegekénél a vizsgálat során csontdenzitometria történt Lunar-DPX DEXA-készülék segítségével (Lunar Radiation Corporation, Madison, WI, Egyesült Államok).

A csontdenzitás (BMD) meghatározása az ágyéki 2-es és 4-es csigolyák között, illetve a combcsontnyakon végzett mérések által történt, T-score alkalmazásával. Osteoporosis vagy osteopenia a Világ Egészségügyi Szervezet (World Health Organization-WHO) klasszifikációs kritériumai alapján lett kimondva (T-score kisebb mint -1) [27]. A betegek egyike sem szenvedett osteoporosisban, vesebetégységben, illetőleg a vizsgálatot megelőzően D-vitamin szedése nem történt.

#### D-vitaminszint meghatározás

A plazma 25-hidroxi-D-vitamin 25(OH)D3-vitamin meghatározások a DEOEC Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetében történtek. A betegek és a kontrollcsoport 25(OH)D3-vitamin szintjének meghatározását nagy hatékonyságú folyadékkromatográfias (HPLC) módszerrel végeztük. A méréshez Jasco műszereket és Bio-Rad reagens kitért használtunk. A mintát (500 µl EDTA-val alvadást gátló 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)D3-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)D3-vitamin koncentrációt, míg D-vitamin hiányállapotnak az 10 ng/ml alatti plazma 25(OH)D3-szintet jelöltük [28].

#### A CD4+CD25+T-sejtek izolálása

A NDC-os 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, Egyesült Államok). 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 kottált és anti-biotin microbead-et tartalmazó jelöléssel távolítottuk el. A mágneses szeparáció során LD oszlopo-

kat használtunk. A CD25+T-sejteket pozitív szelekciós eljárással tisztítottuk meg az ún. „pre-enriched” CD4+T-sejtes frakciótól. Ennek során a CD4+T-sejteket direkt jelöltük anti-CD25 microbead-ekkel majd a CD4+CD25+T-sejteket leoldottuk az MS oszlopról.

#### Szuppressziós assay

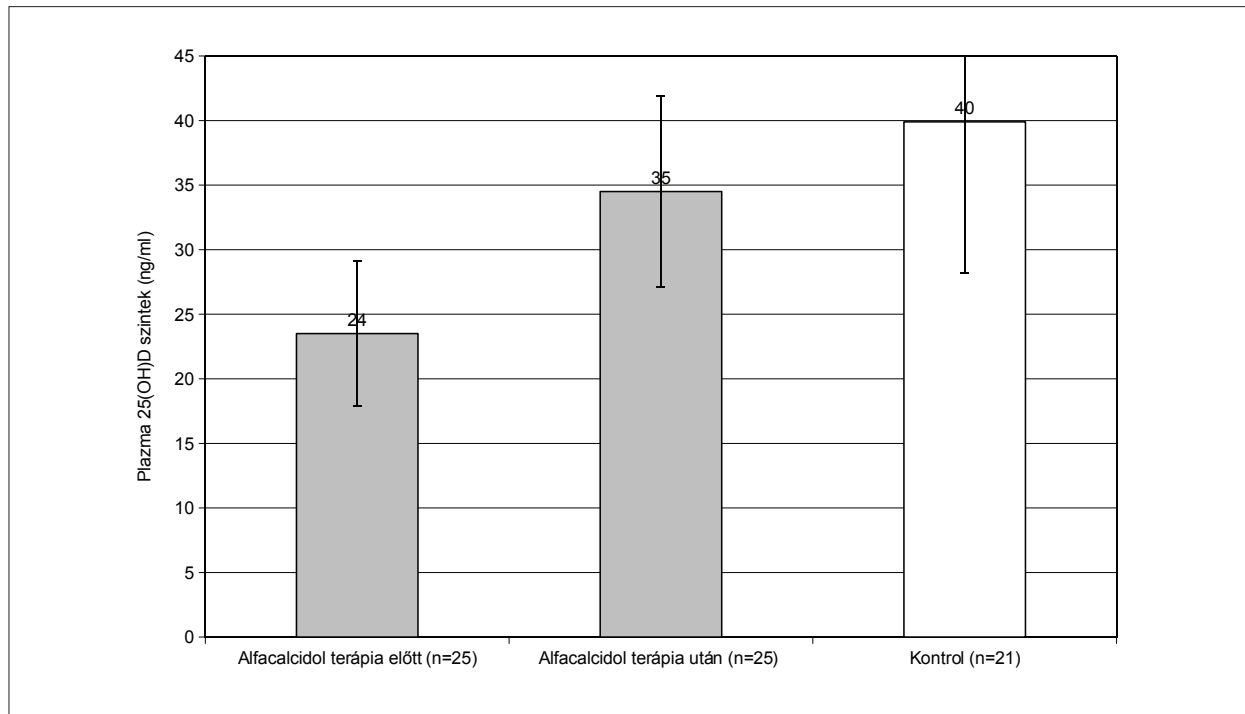
A mágnesesen izolált  $1 \times 10^5$  CD4+CD25+ és CD4+CD25-T-sejteket, önmagukban és együtt tenyésztettük 72 órán keresztül, 200 µl cRPMI 1640 és 96-os „U bottom” plate-ken. A kevert limfocitakultúrában a CD4+CD25+ és a CD4+CD25-sejtek 1:1 arányát alkalmaztuk. A poliklonális stimuláció során a sejteket, anti-CD3/CD28 T-sejt expandáló mikrobead-ekkel stimuláltuk (DynaL Biotech, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Egyesült Államok) 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 limfocitareakció OD-értékeit a CD4+CD25+T-sejtek kultúrájának OD-értékeivel korrigáltuk ( $OD_{MLR_{corr}} = OD_{OD_{MLR}} - OD_{CD25+}$ ). A szuppressziós aktivitást, a kevert limfocitareakció és CD4+CD25+T-sejtkultúrák OD-értékeinek hányadosaként határoztuk meg (proliferatív index =  $OD_{CD25-} / OD_{MLR_{corr}}$ ).

#### A CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3+T-sejtek meghatározása Flow Citométerrel

A Foxp3-festést a gyári előírásnak megfelelően végeztük (eBioscience, San Diego, CA, Egyesült Államok). A polimorfonukleáris sejteket Ficoll/Hystopaque gradiens centrifugával szeparáltuk, majd 100 µl prepreált sejtet adtunk minden csőbe ( $1 \times 10^6$  cell/ml). A sejtek CD4 és CD25 monoklonális antitesttel történő sejt felszíni festése után, a sejteket hideg Flow-citóméter pufferben mostuk (eBioscience). A frissen prepreált 1 ml fixációs/permeabilizációs munka oldatot adtuk hozzá mindegyik mintához. A sejteket 4 °C-on 30–60 percig inkubáltuk sötétben, majd 2 ml 1X permeabilizáló pufferoldatot (eBioscience) adtunk hozzá, és 2%-os (2 µl) normál patkányserummal blokkoltuk a reakciót 1X permeabilizációs pufferben, 4 °C-on 15 percig. A blokkolást követően 20 µl antihumán Foxp3-PE-antitestet adtunk a sejtekhez, majd 4 °C-on legalább 30 percig inkubáltuk azokat sötétben. Végül a sejteket 2 ml 1X permeabilizációs pufferrel mostuk és Flow-citóméter festőpufferben szuszpendáltuk újra (eBioscience). A limfocitákat nagyságuk és granuláltságuk alapján különítettük el. 10000 kapuzott eseményt (limfocitákat) gyűjtöttünk össze minden minta esetén FACSCalibur eszközzel (Becton Dickinson, Heidelberg, Németország). Az adatok analízise során CellQuest szoftvert használtunk (Becton Dickinson). Foxp3-pozitivitást mutató CD4+CD25<sup>high</sup> szuppresszor T-sejtek meghatározása a Foxp3-festődés alapján történt. A Foxp3 átlagos fluoreszcencia intenzitás szignifikánsan magasabb volt a CD4+CD25<sup>high</sup> szuppresszor T-sejtek esetén a CD4+CD25<sup>low</sup> vagy CD4+CD25-sejtekhez képest ( $p < 0,01$ ). A következő reagenseket használtuk: Ficoll és CD4-FITC monoklonális antitest (Sigma Aldrich Corp, St. Louis, MO, Egyesült Államok), CD25-PC5 (Immunotech, Marseilles, Franciaország), Foxp3-PE és intracelluláris festő kit (eBioscience).

#### Az intracitoplazmatikus citokinek meghatározása flow citométerrel

1 ml heparinizált vért hígítottunk kétszeres RPMI 1640-ban (GIBRO-BRL, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Egye-



1. ábra. Plazma 25(OH)D3 vitaminszintek NDC-os betegekben alfalcidol kezelés előtt és után

sült Államok). 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 CO<sub>2</sub> közegben történt. A stimulálatlan, BFA-t tartalmazó sejteket használtuk kontrollként. A sejtek stimulációját követően a sejt felszíni festéshez anti-humán CD4-PC5-t vagy CD8-PC5 antitestet (Immunotech) használtunk, 30 percen át, szobahőmérsékleten. A mintákat mostuk, majd fixáltuk és permeabilizáltuk, IntraPrep™ permeabilizáló reagenst használva a permeabilizáláshoz a gyári előírás szerint (Beckmann Coulter, Egyesült Államok). Ezt követően a mintákat 30 percen keresztül inkubáltuk, sötétben, intracitoplazmatikus antitestre specifikus monoklonális antesttel, anti-humán IL-17-PE-vel (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, Egyesült Államok), 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, Egyesült Államok). Legalább tízezer CD4+- vagy CD8+-sejtet számoltunk (csak CD4+-sejteket a IL-17 esetén) és az eredményeket CXP analízis szoftverrel értékeltük (Beckmann Coulter, Fullerton, CA, Egyesült Államok).

#### A szérumszerű IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-6, IL-17, IL-23 és IL-10 meghatározása ELISA-módszerrel

A szérumszerű citokin-szinteket enzim-linked immunosorbent assay- (ELISA) módszerrel határoztuk meg a gyári előírásnak megfelelően (IL-23 ELISA-kiteket a Bender MedSystems-től, Burlingame, CA, Egyesült Államok; IL-10, IL-17, IL-6, IFN- $\gamma$  és IL-12 (p40) ELISA-kiteket mindegyike a R&D Systemtől, Minneapolis, MN, Egyesült Államok). 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- $\gamma$  esetében. Az intra-assay és inter-as-

say coefficiens <5% és <10% volt minden esetben. Minden minta esetén dupla mérés történt.

#### Statistikai analízis

A statisztikai analízishez az SPSS szoftver 15.0 verzióját használtuk. Az adatokat átlagérték±standard deviáció formájában adtuk meg. A normalitás testek után az adatokat Student-féle *t*-tesztel vagy Mann-Whitney *U*-tesztel 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.

#### Eredmények

##### A vizsgált NDC-os betegek demográfiai jellemzői

A NDC diagnózisakor, a betegek életkora átlagosan 41,05±10,9 (range: 16-62) év, a vizsgálat megkezdésekor a betegség tüneteinek fennállási ideje 2,9±1,3 év volt. Minden vizsgált betegünk nő volt.

##### Plazma D-vitaminszintek orális D-vitaminkezelés előtt és után NDC-os betegekben

A NDC-os betegekben mért plazma-25(OH)D<sub>3</sub>-vitamin szint szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges kontrollokhoz képest (NDC: 23,5±5,6 ng/ml vs. kontroll: 39,9±11,7 ng/ml; *p*=0,001) (1. ábra). Az 5 hetes orális, napi 0,5  $\mu$ g alfalcidol-terápia emelte a plazma-25(OH)D<sub>3</sub>-vitaminszintet, habár a terápia előtt és után mért értékek között nem volt szignifikáns különbség (D-vitaminszintek: 29,7±11,7 ng/ml vs. 34,5±7,4 ng/ml, *p*=0,059). Mindazonáltal a D-vitamin analóg, alfalcidollal való kezelés előtt, minden

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

**I. táblázat. A szérumban IFN-g, IL-12, IL-17, IL-23, IL-6 és IL-10 citokinszintek az alfacalcidol kezelés előtt és után NDC-os betegekben**

vizsgált NDC-os beteg D-vitamin elégtelenségét (<30 ng/ml) jelző D-vitaminszintet mutatott, míg a kezelést követően már csak 7 betegnek (28%) volt D-vitamin-elégtelensége.

#### Szérumban citokinkoncentrációk a NDC-os betegekben, a D-vitamin-terápiát megelőzően és azt követően

A NDC-os betegek kiindulási proinflammatorikus citokin (INF- $\gamma$ , IL-12, IL-17, IL-23 és IL-6) szintjei szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a D-vitamin-kezelés után mért szérumban citokin koncentrációk, míg az IL-10 citokin szint emelkedett a terápiát követően (I. táblázat). A vizsgált NDC-os betegekben, az alfacalcidol terápiát megelőzően mért 25(OH)D3-vitaminszintek fordított korrelációt mutattak a szérumban IL-23 és IL-6 citokin szintekkel (IL-23: -0,713, IL-6: -0,751).

#### CD4+IL-17 expresszáló Th17-sejtek és CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3+T-sejtek vizsgálata a NDC-os betegek szérumban

A Th17 (CD4+IL-17+) sejtek százalékos és abszolút értéke jelentősen magasabb volt a vizsgált NDC-os betegekben a D-vitamin analóggal való kezelést megelőzően, összehasonlítva a kezelést követően mért értékekkel (II. táblázat).

Mindemellett, a természetes Treg- (CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3+) sejtek százalékos és abszolút értéke szignifikánsan emelkedett a D-vitaminkezelés után (a táblázatban csak az abszolút értékeket tüntettük fel).

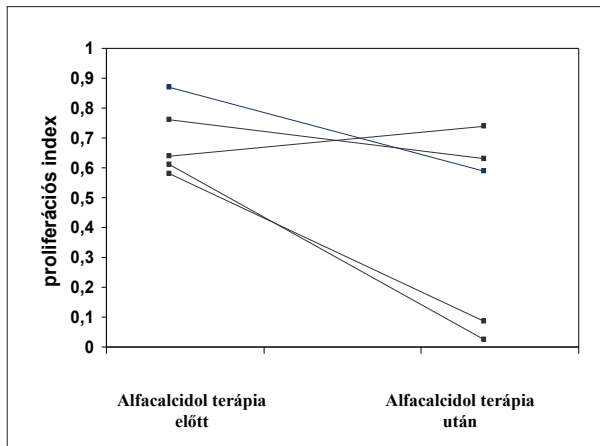
#### Th17/nTreg-egyensúly, NDC-os betegekben az alfacalcidol-kezelés előtt és után

A NDC-os betegek Th17/Treg-sejtjeinek a relatív és az abszolút aránya egyaránt csökkent a D-vitamin-terápiát követően (2. ábra) (CD4+Th17+/CD4+CD25<sup>high</sup>-

	Alfacalcidol kezelés előtt (n=25)	Alfacalcidol kezelés után (n=25)	Szignifikancia
CD4+IL-17+ (G/L)	27,6 $\pm$ 9,9	20,3 $\pm$ 5,07	0,004
CD4+CD25 <sup>high</sup> Foxp3 (G/L)	0,02 $\pm$ 0,01	0,041 $\pm$ 0,023	0,0001
CD4+CD17+T-sejtek / CD4+CD25 <sup>high</sup> Foxp3+T-sejt arány (G/L)	0,0018 $\pm$ 0,0013	0,0005 $\pm$ 0,0034	0,0001

G/L= giga/liter

**II. táblázat CD4+IL-17 expresszáló Th17 sejtek és CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3+T-sejtek a NDC-os betegek szérumban.**



**2. ábra. A CD4+CD25+high Foxp3 T-sejtek szuppressziós aktivitása 5 NDC-os betegben**

Foxp3 százalékban: 0,8 $\pm$ 0,7 vs. 0,23 $\pm$ 0,15, p<0,005; abszolút számban: 0,0018 $\pm$ 0,0013 G/l vs. 0,0005 $\pm$ 0,0034 G/l, p<0,0001).

#### A Treg-sejtek funkcionális aktivitása az alfacalcidol terápiát követően

A CD4+CD25<sup>high</sup>T-sejtek autológ CD4+CD25-T-sejtek proliferációjára kifejtett gátló hatását anti-CD3 és anti-CD28-cal történő stimuláció segítségével vizsgáltuk. A CD4+CD25<sup>high</sup>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). Mindazonáltal, az nTreg-sejtek szuppresszív hatása fokozódott az alfacalcidol terápiát követően (Proliferációs index: 0,638 $\pm$ 0,1 vs. 0,415 $\pm$ 0,15) (2. ábra). A vizsgált 5 NDC-os betegből 4 esetben CD4+CD25<sup>high</sup>T-sejtek, autológ CD4+CD25-sejtek proliferációjára kifejtett gátló hatása javult, míg egy beteg esetén a CD4+CD25<sup>high</sup>T-sejtek szuppressziós aktivitása nem változott az alfacalcidol terápiát követően.

#### Összefoglalás

Az epidemiológiai és a kísérletes adatok szerint a D-vitamin egyike azoknak a környezeti faktoroknak, melynek hiánya alapvető tényező a különböző autoimmun betegségek kifejlődésében, beleértve a SM-t, I. típusú cukorbetegséget, gyulladásos bélbetegségeket (IBD), RA-t és az SLE-t [29, 34]. Összefüggést találtak az I-es típusú diabetes mellitus, 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<sub>3</sub>-vitaminszint esetén fokozott a SM kialakulásának esélye, ami felveti, hogy a D-vitaminterápia hatékony lehet az autoimmun betegségek megelőzésében [30]. Csecsemőknél alkalmazott D-vitamin pótlás szignifikánsan csökkentette az I. típusú diabetes megjelenését egy 30 évvel későbbi felmérésben [23]. Más szerzők azt találták, hogy D-vitamin bevitellel csökkenteni lehet a RA kialakulását [31–33].

A NDC kórállapot az autoimmun betegségek egy speciális fázisa, mivel a betegek 30–40%-a differenciálódik valamely definitív kötőszöveti betegségbe. Kevés adattal rendelkezünk arról, hogy melyek azok a prediktív faktorok, amelyeknek szerepe lehet a betegség progressziójában. Jelenleg intenzív kutatások tárgya azoknak a provokáló faktoroknak a keresése, amelyek elősegítik a NDC kórállapot definitív autoimmun kórképe differenciálódását, és annak vizsgálata, hogy ezek a faktorok hogyan képesek befolyásolni az immunrendszert.

Korábbi munkánkban bemutattuk, hogy a NDC-os betegekben a 25(OH)D<sub>3</sub>-vitaminszintje szignifikánsan alacsonyabb az egészséges populációhoz képest. D-vitaminégtelenséget (<30 ng/ml alatti D-vitaminszint) a betegek 41%-ában (67/161 beteg) mértünk a nyári periódusban, amely tovább növekedett a téli hónapokban [26]. Azok a NDC-os betegek, akiknél a követési idő alatt definitív kötőszöveti betegség alakult ki mindegyike D-vitaminhiányban szenvedett (14,7±6,45 ng/ml vs. 33±13,4 ng/ml p=0,001).

Felmerül a kérdés, hogy vajon a károsodott immunregulációs folyamatok javíthatóak-e D-vitamin pótlással NDC-os betegekben.

Ebben a vizsgálatban elsőként igazoltuk, hogy a D-vitamin analóg alfacalcidol emeli a D-vitaminszintet NDC-os betegekben és a Th1-, valamint Th17-mediált immunfolyamatok javulnak. Tanulmányunkban NDC-os betegeket kezeltük D-vitaminanalóg alfacalcidollal. Plazma 25(OH)D<sub>3</sub>-szint mérésekor D-vitaminégtelenséget mutató NDC-os betegeknél D-vitaminanalóg alfacalcidol, 5 héten keresztül, napi 0,5 µg-ban való terápiás alkalmazását követően, a plazma 25(OH)D<sub>3</sub>-vitamin szintje emelkedett a betegek szérumában. Habár a plazma D-vitaminszint emelkedése nem volt szignifikáns mérvű, az 5 hetes alfacalcidol-kezelést követően a betegeknek mindössze 28%-a (7 beteg) szenvedett még mindig D-vitamin égtelenségben. Mindez arra utal, hogy a folyamatos D-vitaminterápia szükséges lehet D-vitaminhiányos NDC-os betegnél.

Számos tanulmány szerint, a nTreg-sejtek számbeli vagy funkcióbeli károsodása fontos szereppel bír a humán autoimmun betegségek, beleértve a collagen indukálta arthritis, SM, RA és I. típusú cukorbetegség patogenezisében, valamint a Treg-sejtek védőhatással bírtak különböző, atherosclerosist modellező ege-

rekben [35–38, 39]. SM-ben [37], I. típusú cukorbetegségben [40], aktív RA-ben [41], psoriasisban [42] és myasthenia gravisban [43] szenvedő betegeknél szignifikánsan alacsonyabb a CD4+CD25+Treg-sejtek szupportív funkciója, összehasonlítva az egészségesekkel. Korábbi munkánkban azt találtuk, hogy a Foxp3+ Treg-sejtek száma szignifikánsan csökkent az MCTD-s betegekben is, amely további csökkenést mutatott a betegség aktív stádiumában [44].

Korábbi eredményeinkhez hasonlóan, jelen vizsgálatunkban is csökkentnek találtuk az nTreg-sejtek százalékát, illetőleg abszolút számát a NDC-os betegek perifériás vérében, 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 [6].

A funkcionális vizsgálatok során azt találtuk, hogy a NDC-os betegekből származó Treg-sejtek gátolni tudják a CD4+CD25- autológ-T-sejtek proliferációját, és funkcionális aktivitásuk hasonló az egészséges kontrollokéhoz. Ugyanakkor az alfacalcidol terápia növelni képes ugyanezen nTreg-sejtek szuppressziós aktivitását NDC-os betegekben.

A klasszikus autoimmun kórképek számító SLE-ban, az nTreg-sejtek károsodott aktivitását figyelték meg, különösen a betegség aktív stádiumában, valamint csökkent Foxp3+ Treg-sejt számot észleltek SLE-os gyermekben a betegség aktív fázisában [45, 46, 47, 48]. *Valencia* és *mtsai* adatai alapján az SLE-os betegekből származó CD4+CD25<sup>high</sup> Treg-sejtek autológ CD4+CD25+ Treg-sejtek proliferációját gátló aktivitása csökkent az egészséges kontrollokéhoz képest [49]. Az aktív SLE-os betegek CD4+CD25<sup>high</sup> Treg-sejtjeinek szuppresszor funkciója *in vitro* aktivációjuk során helyreállítható volt, amely arra utal, hogy a CD4+CD25<sup>high</sup> 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-os betegek szérumában. A NDC-os betegek szérumában szignifikánsan magasabb arányban tudunk kimutatni IL-17 termelő CD4+ T limfocitákat, az egészséges kontrollokéhoz képest.

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

Ismert, hogy az IL-17, mint potens gyulladáscitokin fokozza a dendritikus sejtek érését. A szérum IL-17 szint emelkedett különböző gyulladáscitokinokban, pl. psoriasisban és RA-ben [50]. A SSc korai fázisában lényegesen magasabb volt az IL-17 szint mint a betegség későbbi stádiumában [51].

SLE-os betegek vizsgálatakor nem találtak egyértelmű összefüggést a szérumban IL-17 vizsgálatakor. Több felmérésben az SLE-os betegekben normál IL-17 szintet írtak le, míg más tanulmányok emelkedettnek találták az IL-17 citokinszinteket a betegség aktivitásával összefüggésben [52]. D-vitamin analógokkal való kezelés gátolta az IL-17-termelő T-sejteket [53].

Vizsgálatunk szerint a D-vitamin analóg alfacalcidol-terápia javítani tudja a NDC-os betegek regulatív működési zavarát. Az alfacalcidol-kezelést követően csökkent az IL-17-expresszió, valamint a szérumban IL-17 szint a vizsgált NDC-os betegekben.

A NDC-os 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 nőtt. Az alfacalcidol-kezelés után a CD4+IL-17+/CD4+CD25+<sup>high</sup>Foxp3+ T-sejtarány módosult, az nTreg-sejtek száma nőtt, a CD4+IL-17+ T-sejtek százalékos arány illetve az abszolút szám csökkent, így a CD4+IL17+/CD4+CD25+<sup>high</sup>Foxp3+T-sejtarány emelkedett. Mindemellett, a D-vitaminpótlás javította a CD4+CD25+<sup>high</sup>T-sejtek szuppressziós képességét is. Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy a D-vitaminpótlás jótékony hatással van a NDC-os betegek immunhomeosztázisának helyreállításában.

Több citokin, mint az IL-23 és IL-6 segíti elő a Th17 irányú differenciálódást. Az IL-23-citokin kulcsfontosságú a patogén, IL-17- és IL-22-termelő CD4+ T-sejtpopuláció expanziójában. Állatmodellben, az IL-23 dependens IL-17-termelő CD4+ effektor T-sejtek (Th17) bejutnak a target szövetekbe, és elősegítik a szerv specifikus autoimmun gyulladásos folyamat kialakulását [54–55]. A humán IL-23 fontos indukáló hatással van a naív CD4+ T-sejtek, humán Th17-irányú sejt differenciálódásában [56]. Az IL-23 p19 emelkedett szintjét figyelték meg különböző humán autoimmun kórképekben, mint például SM-ben, SLE-ban, valamint Bechet-kórban [57, 58].

Az IL-6 citokinnek szintén esszenciális jelentősége van a Th17 sejt vonal indukációjában. Az IL-6 egy pleiotrop citokin, melynek különböző gyulladásos folyamatokban fontos. Több, az utóbbi időben végzett vizsgálatban azt találták, hogy az IL-6 targetje ROR $\gamma$ , és az IL-6 hatására a TGF- $\beta$  szignál útvonalon keresztül Th17-sejtek alakulnak ki. A T-sejt receptor jelenlétében, a naív CD4+ T-sejtek IL-6 és TGF- $\beta$  citokinekkel történő stimulációja szinergista módon hat a sejteken történő ROR $\gamma$  expressziójára. *In vivo* patkány modell szerint IL-6 gp130-STAT-szignál útvonal fontos szerepet játszik a Th17 sejtek megjelenésében [59].

Munkánkban elsőként láttuk, hogy a proinflammatorikus IL-12, IFN- $\gamma$  citokinek és a Th17-hez asszociálható citokinek, mint az IL-17, IL-23 és IL-6 szignifikánsan emelkedett NDC-os betegekben. A D-vitamin analóg alfacalcidol, úgy tűnik, elsődlegesen gátolja a naív CD4+ T-sejtek Th1- és Th17-irányú differenciálódását.

Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a D-vitamin analóg alfacalcidol-terápia csökkenti a IL-17 citokinprodukción, mérsékli a proinflammatorikus citokinek, mint az IL-6, IL-17 és IL-23 citokinek szintjeit, illetőleg csökkenti a Th1 típusú immunválaszra jellemző citokinek (IFN- $\gamma$  és IL-12) plazmakoncentrációját. Eredményeink szerint, az alfacalcidol egyaránt gátolja Th1- és Th17-sejteket, miközben elősegíti az IL-10 regulatív citokin választ. Kimutattuk, hogy a CD4+CD25+<sup>high</sup>Foxp3+ regulatív T-sejtek százalékos aránya és funkcionális aktivitása emelkedik D-vitamin analóg hatására.

Összefoglalásképpen, adataink szerint NDC-os betegekben Th17/Treg egyensúlyzavar áll fenn, amelynek szerepe lehet a definitív kötőszöveti betegségbe való differenciálódásban. A Th17-sejtek, ellentétben az nTreg-sejtekkel szöveti gyulladást és a betegség progresszióját idézhetik elő.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a D-vitaminhiánynak alapvető szerepe lehet a NDC progressziójában, a különböző proinflammatorikus folyamatok előtérbe kerülése által, továbbá a D-vitaminpótlás képes javítani az immunhomeostasis zavarát. A D-vitamin-terápia szükséges lehet a D-vitaminhiányos NDC-os betegnél és megelőzheti, vagy legalábbis lassíthatja a definitív autoimmun kötőszöveti betegségbe való differenciálódást. A citokintermelő T-sejtek további megismerése, a nTreg-sejtek funkcionális aktivitásának vizsgálata további előrelépést jelenthet a NDC terápiás stratégiájának kialakításában. Az alfacalcidol, immunmodulatív hatása révén új terápiás vonalat képviselhet NDC kór állapot kezelésében.

## Irodalom

- [1] Mosca, M., Tani, C., Neri, C., Baldini, C., Bombardieri, S.: Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD). *Autoimmun Rev* 2006, 6, 1–4.
- [2] 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.
- [3] Bodolay, E., Csiki, Z., Szekanecz, Z., Ben, T., Kiss, E., Zeher, M., Szűcs, G., Dankó, K., Szegedi, Gy.: Five-year follow-up of 665 Hungarian patients with undifferentiated connective tissue disease (UCTD). *Clin Exp Rheumatol* 2003, 21, 313–320.
- [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, 5, 585–591.
- [5] 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, 2, 95–100
- [6] Szodoray, P., Nakken, B., Baráth, S., Gaál, J., Aleksza, M., Zeher, M., Sipka, S., Szilágyi, A., Zöld, E., Szegedi, Gy., Bodolay, E.: Progressive divergent shifts in natu-

- ral and induced T-regulatory cells signify the transition from undifferentiated to definitive connective tissue disease. *Int Immunol* 2008, 20, 8, 971–979.
- [7] Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V. F. I., Bernemann, Z. N.: Regulatory T cells and human disease. *Clin and Developmental Immunology* 2007. jul.
- [8] Harrington, L. E., Mangan, P. R., Weaver, C. T.: Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the TH17 lineage. *Curr Opin Immunol* 2006, 18, 3, 349–356.
- [9] Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., Dong, C.: A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005, 6, 11, 1133–41.
- [10] Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V. K.: Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008, 453, 7198, 1051–1057.
- [11] Chen, Z., O’Shea, J. J.: Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol Res* 2008, 41, 87–102.
- [12] 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.
- [13] Chabaud, M., Durand, J. M., Buchs, N., Fossiez, F., Page, G., Frappart, L., Miossec, P.: Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1999, 42, 5, 963–970.
- [14] Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., et al.: Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 2002, 8, 500–508.
- [15] Kolls, J. K., Linden, A.: Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004, 21, 467.
- [16] Amadi-Obi, A., Yu, C. R., Liu, X., Mahdi, R. M., Clarke, G. L., Nussenblatt, R. B., et al.: TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* 2007, 13, 711–718.
- [17] Arnsou, Y., Amital, H., Shoenfeld, Y.: Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis* 2007, 66, 9, 1137–1142.
- [18] Chun, R., Adams, J., Hewison, M.: Back to the future: a new look at ‘old’ vitamin D. *J Endocrinol* 2008 May 21.
- [19] 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, 1, 178, 1, 145–153.
- [20] Bikle, D. D.: What is new in vitamin D: 2006–2007. *Curr Opin Rheumatol* 2007, 19, 383–388.
- [21] Deluca, H. F., Cantorna, M.: Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J* 2001, 15, 2579–2585.
- [22] 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, 1, 23–33.
- [23] Hypponen, E., Laara, E., Reunanen, A., Jarvelin, M. R., and Virtanen, S.M.: Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001, 358, 1500–1503.
- [24] Kamen, D. L., Cooper, G. S., Bouali, H., Shaftman, S. R., Hollis, B. W., and Gilkeson, G. S.: Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2006, 5, 114–117.
- [25] Littorin, B., Blom, P., Scholin, A., Arnqvist, H. J., Blohme, G., Bolinder, J., Ekblom-Schnell, A., Eriksson, J. W., Gudbjornsdottir, S., Nystrom, L., Ostman, J., and 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.
- [26] Zöld, E., Szodoray, P., Gaál, J., Kappelmayer, J., Csáthy, L., Gyimesi, E., Zeher, M., Szegedi, Gy., Bodolay, E.: Vitamin D deficiency in undifferentiated connective tissue disease. *Arthritis Res Ther* 2008, 18, 10, 5, R123.
- [27] 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, 5, 901–910.
- [28] Hollis, B. W. and Wagner, C. L.: Normal serum vitamin D levels. *N Engl J Med* 2005, 352, 515–516.
- [29] Cantorna, M. T. and Mahon, B. D.: Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med* (Maywood) 2004, 229, 1136–1142.
- [30] Munger, K. L., Zhang, S. M., O’Reilly, E., et al.: Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 2004, 62, 60–65.
- [31] Merlino, L. A., Curtis, J., Mikuls, T. R., et al.: Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Woman’s Health Study. *Arthritis Rheum* 2004, 50, 72–77.
- [32] Andjelkovic, Z., Vojinovic, J., Pejnovic, N., et al.: Disease modifying and immunomodulatory effects of high dose 1 alpha (OH) D3 in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 1999, 17, 453–456.
- [33] 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 and Rheum* 2007, 56, 2143–2149.
- [34] Kamen, D., Aranow, C.: Vitamin D in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2008, 20, 532–537.
- [35] Liu, M. F., Wang, C. R., Fung, L. L., et al.: Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2004, 59, 198–202.
- [36] Möttönen, M., Heikkinen, J., Mustonen, L., et al.: CD4+CD25+ T cells with 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.
- [37] 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.
- [38] Kukreja, A., Cost, G., Marker, J., Zhang, C., Sun, Z., Lin-Su, K., et al.: Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 2002, 109, 131–140.
- [39] 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.
- [40] 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, 1, 92–99.
- [41] 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-TNF-alpha therapy. *J Exp Med* 2004, 2, 200, 3, 277–285.
- [42] 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, 1, 174, 1, 164–173.
- [43] Balandina, A., Lécart, S., Dartevelle, 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, 2, 735–741.
- [44] Baráth, S., Sipka, S., Aleksza, M., Szegedi, A., Szodray, P., Végh, J., Szegedi, Gy, Bodolay E.: Regulatory T cells in peripheral blood of patients with mixed connective tissue disease. *Scand J Rheumatol* 2006, 35, 4, 300–304.
- [45] Mellor-Pita, S., Citores, M. J., Castejon, R., et al.: Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2006, 65, 553–554.
- [46] Alvarado-Sánchez, B., Hernández-Castro, B., Portales-Pérez, D., Baranda, L., Layseca-Espinosa, E., Abud-Mendoza, C., Cubillas-Tejeda, A. C., González-Amaro, R.: Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2006, 27, 2, 110–118.
- [47] Lyssuk, E. Y., Torgashina, A. V., Soloviev, S. K., Nasonov, 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.
- [48] Lee, J. H., Ang L. C., Lin, Y. T., et al.: Inverse correlation between CD4 regulatory T-cell population and autoantibody levels in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2006, 117, 280.
- [49] Valencia, X., Yarboro, C., Illei, G., Lipsky, P. E.: Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunology* 2007, 178, 2579–2588.
- [50] 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.
- [51] Kurasawa, K., Hirose, K., Sano, H., Endo, H., Shinkai, H., Nawata, Y., Takabayashi, K., Iwamoto, I.: Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000, 43, 11, 2455–2463.
- [52] 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, 3, 385–393.
- [53] Penna, G., et al.: Treatment of experimental autoimmune prostatitis in nonobese diabetic mice by the vitamin D receptor agonist elocalcitol. *J Immunol* 2006, 177, 8504–8511.
- [54] Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., et al.: IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005, 201, 233–240.
- [55] Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., et al.: 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.
- [56] Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., et al.: Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007, 8, 950–957.
- [57] 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, 5, 1317–1326.
- [58] Chi, W., Zhu, X., Yang, P., Liu, X., Lin, X., Zhou, H., Huang, X., Kijlstra, A.: Upregulated IL-23 and IL-17 in Behçet patients with active uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, 49, 7, 3058–3064.
- [59] Hishihara, M., Ogura, H., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Tsuji, T., Aono, H., et al.: IL-6-gp130-STAT3 in T cells direct the development of IL-17+Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *International Immunology* 2007, 19, 695–702.

Levelezés: Zöld Éva dr., DEOEC 4032 Debrecen, Móricz Zs. krt. 22., tel./fax: (06-52) 414-969, e-mail: zold\_eva@yahoo.com