

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Татјана В. Живановић Раднић

**ИСПИТИВАЊЕ
ИМУНОМОДУЛАТОРНИХ ЕФЕКТА
АЛФАКАЛЦИДОЛА КОД
ПАЦИЈЕНАТА СА АКТИВНИМ
РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ**

докторска дисертација

Београд, 2016

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Tatjana V. Živanović Radnić

**ISPITIVANJE IMUNOMODULATORNIH
EFEKATA ALFAKALCIDOLA KOD
PACIJENATA SA AKTIVNIM
REUMATOIDNIM ARTRITISOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

MEDICAL FACULTY

Tatjana V. Živanović Radnić

**IMMUNOMODULATORY EFFECT OF
ALFACALCIDOL IN PATIENTS WITH
ACTIVE RHEUMATOID ARTHRITIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentor: dr Mirjana Šefik Bukilica, docent, Univerzitet u Beogradu,
Medicinski fakultet

Komentor: dr Jelena Vojinović, redovni profesor, Univerzitet u Nišu,
Medicinski fakultet

Komisija u sastavu:

dr Nemanja Damjanov, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Medicinski fakultet

dr Ivanka Marković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Medicinski fakultet

dr Nevena Arsenović Ranin, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Farmaceutski fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije:

Za Vuka i Miu...

čija me ljubav i postojanje čine beskrajno srećnom i ponosnom

Ova doktorska disertacija je uradjena na Institutu za reumatologiju u Beogradu pod rukovodstvom Prof dr Nemanje Damjanova, Prof dr Jelene Vojinović i Doc dr Mirjane Šefik-Bukilica. Deo eksperimenata izveden je u saradnji sa Laboratorijom Instituta za biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Ivanke Marković. Koristim ovu priliku da im se svima srdačno zahvalim.

Svom mentoru, **Doc. dr Mirjani Šefik Bukilica**, zahvaljujem se na ukazanom poverenju i nesebičnoj pomoći prilikom uobličavanja i finalizacije ove disertacije. Takođe, zahvaljujem se na iskrenoj ličnoj i profesionalnoj podršci i razumevanju tokom svih faza izrade ove doktorske disertacije.

Prof. dr Jeleni Vojinović zahvaljujem se na korisnim savetima i sugestijama, kao i na bezrezervnom poverenju. Njene pohvale i kritike uvek su bile dragocene u procesu nastanka ove doktorske disertacije i doprinele boljem kvalitetu rada.

Prof. dr Nemanji Damjanov se zahvaljujem na ukazanom bezrezervnom poverenju i profesionalnoj pomoći, stalnom interesovanju za ovaj rad i konstantnoj podršci da istrajem na svom profesionalnom putu.

Prof. dr Ivanki Marković dugujem posebnu zahvalnost na ukazanom poverenju i strpljenju kao i konstantnoj spremnosti na saradnju i pomoć pri izvođenju zahtevnih molekularnobioloških tehnika. Takođe, zahvaljujem joj se za pomoć u prvim koracima koje sam napravila na svom naučnoistraživačkom putu.

Prof. dr Neveni Arsenović Ranin se zahvaljujem na pomoći i spremnosti na saradnju u finalnim fazama pripreme ove disertacije.

Najiskrenije se zahvaljujem celokupnom kolektivu Instituta za reumatologiju i Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu na svesrdnoj podršci i srdačnoj radnoj atmosferi. Duh prijateljstva i tolerancije koji vlada u ova dva kolektiva, doprineo je zadovoljstvu istraživanja i ublažio poteškoće tokom rada.

Hvala kolegini **dr sci med Katarini Simić Pašalić** na višegodišnjoj saradnji na zajedničkom istraživanju.

Zahvaljujem se **Doc. dr Sonji Misirlić Denčić**, svojoj kolegini i iskrenoj i pravoj prijateljici, koja mi je tokom eksperimentalnog rada, pisanja i objavljivanja rezultata pružila nesebičnu pomoć. Hvala joj na prisustvu u svakoj fazi moga života, na toploj prijateljskoj reči. Podrška i razumevanje koje je nesebično pružala učinili su moj put lakšim.

Posebno se zahvaljujem svojoj kolegini i prijateljici **dr Ljiljani Kovačević** na dragocenoj saradnji, pomoći i podršci koja prevazilazi okvire ove disertacije.

Neizmerno hvala **Prof. dr Nataši Petronijević** na dugogodišnjoj saradnji, pomoći i prijateljstvu, kao i primedbama i sugestijama u prelomnim trenutcima tokom pisanja ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem Višim laboratorijskim tehničarima **Bojani Višekruni, Nadi Bojović i Slavici Steković** za svesrdnu pomoć koju su mi pružile u svakoj fazi izrade ove disertacije.

Veliko hvala mojim iskrenim prijateljima, **dr Ivici Jeremić, Katarini Stančić, dr Mariji Milosavljević i dr Sanji Milošević** na velikoj podršci i dobroj energiji.

Neizmerno hvala mom **suprugu Branku, mojoj porodici, roditeljima i sestri** na безусловnoj podršci tokom svih faza mog profesionalnog puta.

Posebno se zahvaljujem mome ocu **Vlastimiru Radniću**, koji je oduvek bio najveći “vetar u leđa”, oslonac i bezrezervno verovao u moj put.

ISPITIVANJE IMUNOMODULATORNIH EFEKATA ALFAKALCIDOLA KOD PACIJENATA SA AKTIVNIM REUMATOIDNIM ARTRITISOM

REZIME

Poslednjih godina, otkriće ekspresije vitamin-D receptora (VDR) u ćelijama imunskog sistema i činjenica da neke od ovih ćelija i produkuju D hormon, govore u prilog postojanja imunomodulatorne uloge vitamina D u organizmu. Sintetski analog hormona D, alfa-kalcidol, se koristi u prevenciji i lečenju osteoporoze ali nekoliko studija ukazalo je na njegov mogući terapijski potencijal i u reumatoidnom artritisu. U cilju proučavanja delovanja alfa-kalcidola primenjeni su komplementarni *in vivo*, *in vitro* i *ex vivo* pristupi koji su podrazumevali ispitivanje imunomodulatornih efekata alfa-kalcidola kod zdravih kontrola i kod bolesnika sa aktivnim reumatoidnim artritisom (RA). U ispitivanje je uključeno 16 bolesnika sa RA, oba pola, sa aktivnom bolešću (DAS 28 (SE) >3.2, uprkos terapiji lekovima koji menjaju tok bolesti (LMTB) tokom najmanje mesec dana i 20 zdravih dobrovoljaca (iste distribucije pola i godina starosti) - kontrolna grupa zdravih. Bolesnici sa RA su pored svoje redovne LMTB terapije, dobijali svakodnevno alfa-kalcidol (2mcg/dan), u trajanju od 12 nedelja. Uzorci periferne krvi su uzimani zdravim kontrolama i bolesnicima pre i posle 12 nedelja terapije alfa-kalcidolom. Iz uzoraka periferne krvi zdravih kontrola i bolesnika sa RA izolovane su mononuklearne ćelije periferne krvi (MČPK) koje su kultivisane *in vitro*. U kulturama MČPK zdravih kontrola i bolesnika sa aktivnim RA pre terapije alfa-kalcidolom ispitivan je efekat *in vitro* suplementacije alfa-kalcidolom, kalcitriolom, metilprednizolonom i istovremeno alfa-kalcidol/metilprednizolon suplementacijom na stimulisanu produkciju citokina. Iz supernatanata MČPK ćelijske kulture određivani su nivoi citokina IL-6, IL-17, IL-21, TNF- α , IL-4, IL-10, TGF- β i IFN- γ ELISA metodom. U kulturama MČPK izolovanih iz periferne krvi bolesnika sa RA pre i posle dvanaestonedeljne terapije sa alfa-kalcidolom i zdravih kontrola merena je stimulisana produkcija citokina ELISA metodom i analizirano prisustvo reaktivnih kiseoničnih jedinjenja i potencijal mitohondrijalne membrane limfocita metodom protodne citofluorimetrije. U uzorcima periferne krvi određivani su: vrednosti serumskog 25(OH)D metodom elektrohemiluminiscencije, parametri zapaljenja (SE eritrocita i serumska koncentracija C-reaktivnog proteina), parametri aktivnosti bolesti (kompozitni indeks DAS 28), vrednosti serumskih citokina ELISA metodom, parametri oksidativnog stresa (aktivnost antioksidativnih enzima SOD, CAT i GPx

kao i nivo MDA u plazmi) spektrofotometrijskom metodom. Fenotipska karakterizacija limfocita iz periferne krvi pacijenata vršena je tehnikom direktne i indirektno imunofluorescencije korišćenjem protočnog citofluorimetra BD FACS Aria III™. U obradi podataka korišćene su metode deskriptivne i analitičke statistike. Normalnost raspodele kvantitativnih numeričkih obeležja testirana je pomoću Kolmogorov-Smirnov testa. Studentov T-test je bio korišćen za testiranje statističke značajnosti razlika između grupa po kontinuiranim varijablama koje se ponašaju po tipu normalne raspodele, dok su obeležja koja odstupaju od normalne raspodele analizirana pomoću Mann Whitney-U testa. Za testiranje statističke značajnosti razlika u učestalosti atributivnih obeležja posmatranja korišćeni su Pirsonov χ^2 – test i Fišerov (exact) test.

Alfakalcidol je pokazao, u in vitro uslovima, značajno imunomodulatorno dejstvo sa specifičnom inhibicijom Th1-citokina dok je Th2 ćelijski odgovor bio pojačan. Suplementacija alfakalcidolom i kalcitriolom in vitro smanjuje produkciju proinflammatoryh citokina (IL-6, TNF- α , IL-21 i IL-17) i indukuju intenzivniju produkciju antiinflammatoryh citokina (IL-4, IL-10, IFN- γ i TGF- β) u kulturi MČPK zdravih kontrola i bolesnika sa aktivnim reumatoidnim artritismom – “Th2 switch”. Nije bilo značajne razlike u efektima delovanja alfakalcidola i kalcitriola. Suplementacija metilprednizolonom dovodi do statistički značajnog porasta produkcije IL-17, IL-4 i IFN- γ kod zdravih kontrola, dok je zabeleženo značajno smanjenje produkcije IL-6, IL-17, TNF- α i IL-4 u grupi bolesnika sa RA. Istovremena suplementacija alfakalcidolom i metilprednizolonom dovodi do dodatnog, još potenciranijeg statistički značajnog povećanja produkcije IL-4 i IFN- γ i smanjenja produkcije IL-17 i IL-21 kod zdravih kontrola, dok je smanjenja produkcije IL-17 i TNF- α zabeleženo u grupi bolesnika sa RA. Posle 12 nedelja terapije alfakalcidolom u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa reumatoidnim artritismom dolazi do statistički veoma značajnih promena stimulisane produkcije proinflammatoryh i anti-inflammatoryh citokina. Produkcija IL-6, IL-17 i TNF- α je statistički značajno niža dok je produkcija IL-10, TGF- β i IFN- γ statistički značajno viša u odnosu na vrednosti pre terapije. Procenat aktiviranih regulatornih T limfocita u perifernoj krvi bolesnika sa aktivnim RA je bio niži u odnosu za kontrolnu grupu zdravih. Posle 12 nedelja terapije alfakalcidolom dolazi do povećanja procenta aktiviranih T regulatornih ćelija i to do nivoa koji je zabeležen u grupi zdravih

kontrola. Oralna terapija alfakalcidolom u toku 12 nedelja dovela je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti bolesti merenog DAS28 (SE) skorom (Δ DAS28 >1,5), i značajnog smanjenja nivoa C-reaktivnog proteina. Primena terapije alfakalcidolom značajno je modulirala parametre oksidativnog stresa u perifernoj krvi bolesnika sa aktivnim Reumatoidnim artritismom u pravcu antioksidativne zaštite.

Naši rezultati govore u prilog postojanja značajnog imunomodulatornog potencijala alfakalcidola u bolestima posredovanim Th1/Th17 ćelijskim odgovorom.

Ključne reči: alfakalcidol, imunomodulatorno dejstvo, mononuklearne ćelije periferne krvi, citokini, oksidativni stres, regulatorne T ćelije

IMMUNOMODULATORY EFFECT OF ALFACALCIDOL IN PATIENTS WITH ACTIVE RHEUMATOID ARTHRITIS

ABSTRACT

The discovery of vitamin D receptor (VDR) expression in the cells of the immune system and the fact that some of these cells produce D hormone indicate immunomodulatory role of vitamin D. Hormone D synthetic analog, alfacalcidol, is used in the prevention and treatment of osteoporosis. Several recent studies pointed to its possible therapeutic potential in rheumatoid arthritis. In order to study alfacalcidol effects, we applied complementary *in vivo*, *in vitro* and *ex vivo* approach that included testing the immunomodulatory effects of alfacalcidol in healthy controls and patients with active rheumatoid arthritis. In sixteen patients with active RA (DAS 28(SE) score >3.2) of both sexes, alfacalcidol (2 μ g/day) was added to previously applied therapy (stable dose of methotrexate, without any steroid therapy) during three months. Twenty healthy volunteers (same distribution gender and age) were control group. Peripheral blood samples were taken from healthy controls once at the beginning of the study, and from patients before and after 12 weeks of alfacalcidol therapy. Patients and healthy controls peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated and cultured *in vitro*. In PBMC cultures of healthy controls and patients with active RA, *in vitro* effects of supplementation with alfacalcidol, calcitriol, methylprednisolone and cotreatment with alfacalcidol/methylprednisolone were studied. Stimulated production of cytokines IL-6, IL-17, IL-21, TNF- α , IL-4, IL-10, TGF- β and IFN- γ were determined by ELISA. In PBMC cultures isolated from peripheral blood of patients with RA before and after twelve weeks of treatment with alfacalcidol and healthy controls, stimulated cytokine production by ELISA was measured and the presence of reactive oxygen compounds and mitochondrial membrane potential of lymphocytes were analyzed by flow cytometry. From the peripheral blood samples were determined: serum 25(OH)D by electrochemiluminescence method, parameters of inflammation (erythrocyte SE and serum C-reactive protein), the parameters of disease activity (DAS composite index 28), serum cytokines by ELISA method and the parameters of oxidative stress (antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx and GSH level in the lysate of erythrocytes and plasma levels of MDA) by spectrophotometric method. Phenotypic characterization of cells from the peripheral blood of patients was performed by direct

and indirect immunofluorescence using flow cytometry BD FACS Aria™ III. Methods of descriptive and analytical statistics for data processing were used. Normality of distribution of quantitative numerical characteristics was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Student's t-test was used to test the statistical significance of differences between groups after continuous variables behave according to the type of normal distribution. The characteristics that deviate from normal distribution were analyzed using the Mann-Whitney U test. To test the statistical significance of differences in the frequency of attributive characteristics of observation Pearson χ^2 - test and Fisher (exact) test were used.

Our results showed that alfacalcidol, in vitro, showed a significant immunomodulatory effect through the specific inhibition of Th1- cytokine production, while Th2 and the cell response was enhanced. Supplementation with alfacalcidol and calcitriol in vitro reduces the production of proinflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , IL-21 and IL-17) and induce more intense anti-inflammatory cytokine production (IL-4, IL-10, IFN- γ and TGF- β) in PBMC cultures of healthy controls and patients with active rheumatoid arthritis - "Th2 switch". There was no significant difference between the effects of alfacalcidol and calcitriol. Methylprednisolone supplementation leads to a significant increase of IL-17, IL-4 and IFN- γ in healthy controls, while there was a significant reduction of the IL-6, IL-17, TNF- α and IL-4 production in the group of patients with RA. Cotreatment with alfacalcidol and methylprednisolone leads to additional, more statistically significant increase of IL-4 and IFN- γ , and reduction of IL-17 and IL-21 production in healthy control. Production of IL-17 and TNF- α was reduced in the group of patients with RA. After 12 weeks of alfacalcidol treatment, our results showed statistically significant change of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines stimulated production in the PBMC culture of patients with rheumatoid arthritis. Production of IL-6, IL-17 and TNF- α was significantly lower and IL-10, TGF- β and IFN- γ production was statistically significantly higher than before treatment. The percentage of activated regulatory T lymphocytes in the peripheral blood of patients with active RA was lower compared to the control group. After 12 weeks of alfacalcidol treatment the percentage of activated T regulatory cells was increased to a level that was recorded in a group of healthy controls. Twelve weeks of the oral alfacalcidol therapy resulted in a statistically significant reduction of disease activity measured by DAS28 (SE)

score (Δ DAS28 > 1.5), and a significant reduction of C-reactive protein plasma levels. Alfacalcidol therapy significantly modulated parameters of oxidative stress in the peripheral blood of patients with active rheumatoid arthritis towards antioxidant protection. Our results indicate the significant immunomodulatory potential of alfacalcidol in Th1/Th17 cell mediated diseases.

Keywords: alfacalcidol, immunomodulatory effect, peripheral blood mononuclear cells, cytokines, oxidative stress, T reg

SADRŽAJ:

1 UVOD	1
1.1 <i>Autoimunost i regulacija imunskog odgovora</i>	1
1.1.1. <i>regulacija citokinske mreže</i>	1
1.1.2. <i>regulatorne t ćelije</i>	2
1.1.3. <i>oksidativni stres</i>	4
1.2 <i>Reumatoidni artritis</i>	5
1.1.1. <i>imunska etio-patogeneza reumatoidnog artritisa</i>	5
1.1.2. <i>kliničke manifestacije i procena aktivnosti RA</i>	7
1.3 <i>Vitamin D - Hormon D</i>	8
1.3.1. <i>Vitamin D i reumatoidni artritis</i>	9
1.3.2. <i>Fiziološka regulacija i sinteza D hormona</i>	10
1.3.3 <i>Vitamin D receptor (VDR) i mehanizam delovanja hormona D</i> ... 11	
1.3.4 <i>“Vitamin D” - steroidni imunomodulatorni hormon</i>	14
1.4 <i>Vitamin D receptor (VDR) agonisti</i>	17
2. RADNE HIPOTEZE	21
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	22
4. MATERIJAL I METODE	24
4.1. <i>Dizajn studije</i>	24
4.2. <i>Studijski protokol</i>	25
4.3. <i>Ćelijska Kultura</i>	26
4.3.1. <i>Izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi</i>	27
4.3.2. <i>Priprema medijuma za kultivisanje ćelija</i>	27
4.3.3. <i>Kultivisanje ćelija</i>	27
4.3.4. <i>Ispitivanje uticaja alfa-kalcidola i kalcitriola na vijabilitet ćelija</i>	28
4.4. <i>Tretman ćelija u kulturi</i>	28

4.5.	<i>Analiza karakteristika ćelija u kulturi primenom protočne citometrije (facs analiza).....</i>	29
4.6.	<i>Određivanje produkcije citokina.....</i>	31
4.7.	<i>Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima</i>	32
4.8.	<i>Određivanje regulatornih T ćelija... ..</i>	34
4.9.	<i>Merenje nivoa vitamina D</i>	35
4.10.	<i>Određivanje parametara aktivnosti bolesti.....</i>	36
4.11.	<i>Statistička analiza.....</i>	36
5.	REZULTATI.....	38
5.1.	Uticaj alfakalcidola i kalcitriola na vijabilitet mononuklearnih ćelija periferne krvi u kulturi.....	38
5.2.	<i>Efekat različitih in vitro tretmana na produkciju citokina u stimulisanoj kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih osoba.....</i>	41
5.2.1.	<i>Koncentracija citokina u stimulisanoj kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih kontrola pod dejstvom različitih tretmana</i>	41
5.2.2.	<i>Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IL-4 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih kontrola.....</i>	42
5.2.3.	<i>Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IL-17 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih kontrola.....</i>	43
5.2.4.	<i>Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IL-21 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih kontrola.....</i>	45
5.2.5.	<i>Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju TNF-a u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih kontrola.....</i>	47
5.2.6.	<i>Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IFN-γ u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih kontrola.....</i>	48

5.3.	<i>Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju citokina u stimuliranoj kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA...</i>	49
5.3.2.	<i>Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IL-4 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA.....</i>	52
5.3.3.	<i>Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IL-6 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA.....</i>	53
5.3.4.	<i>Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IL-10 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA.....</i>	54
5.3.5.	<i>Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IL-17 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA.....</i>	56
5.3.6.	<i>Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IL-21 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA.....</i>	57
5.3.7.	<i>Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju TNF-α u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA.....</i>	59
5.3.8.	<i>Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju TGF-β u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA.....</i>	60
5.3.9.	<i>Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IFN-γ u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA.....</i>	61
5.4.	<i>Produkcija citokina u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim ra pre i posle terapije alfa-kalcidolom.....</i>	63
5.5.	<i>Koncentracija citokina u serumu bolesnika sa ra pre i posle terapije alfa-kalcidolom.....</i>	71
5.6.	<i>Regulatorni T limfociti periferne krvi bolesnika sa ra pre i posle terapije alfa-kalcidolom... ..</i>	73
5.7.	<i>Parametri oksidativnog stresa pre i posle terapije alfa-kalcidolom..</i>	74

5.8.	<i>Serumska koncentracija vitamina D</i>	77
5.9.	<i>Uticaj terapijske primene alfa-kalcidola na parametre aktivnosti reumatoidnog artritisa</i>	78
5.9.1.	<i>Markeri zapaljenja.....</i>	78
5.9.2.	<i>Indeks aktivnosti reumatoidnog artritisa (DAS 28 (SE)).....</i>	79
6.	DISKUSIJA.....	81
7.	ZAKLJUČCI.....	95
8.	LITERATURA.....	97

1 UVOD

1.1. AUTOIMUNOST I REGULACIJA IMUNSKOG ODGOVORA

Autoimunost predstavlja reaktivnost prema sopstvenim antigenima. Iako je poznato da je nizak stepen autoreaktivnosti fiziološka pojava (Dighiero i sar, 1999) i da, štaviše, preživljavanje naivnih T i B ćelija na periferiji zahteva njihovo stalno izlaganje autoantigenima (Goldrath i Bevan, 1999), poremećaj osnovnih mehanizama održavanja autotolerancije može da dovede do pojave autoimunskih oboljenja. Razumevanje mehanizama kojim fiziološka autoimunost postaje patološka, što uslovljava nastanak autoimunskih oboljenja, predstavlja jedan od ključnih zadataka kako bazične tako i kliničke imunologije. U osnovi nastanka autoimunskih bolesti stoje poremećaji u selekciji T i B limfocita, njihovoj regulaciji i smrti potencijalno autoreaktivnih klonova (Goodnow i sar, 2001; Marrack i sar, 2001). Autoimunske bolesti nisu redak medicinski fenomen, već, naprotiv, imaju visok morbiditet i mortalitet i predstavljaju treći klinički problem u razvijenom svetu, odmah posle kardiovaskularnih bolesti i malignih tumora (Nossal, 2001). Autoimunost može da zahvati različite organe, uzrokujući bolesti koje se kreću u rasponu od sistemskih koje obuhvataju više sistema i organa (kao što je reumatoidni artritis ili sistemski eritemski lupus), pa do onih usmerenih samo na jedan organ, odnosno tkivo (npr. multipla skleroza ili insulin-zavisni dijabetes melitus).

1.1.1 Regulacija citokinske mreže

Inflamatorni citokini su aktivno uključeni u patogenezu autoimunskih bolesti, od kojih mnoge nisu do skoro otkrivene. Ovde, članovi IL-12 porodice igraju centralnu ulogu (Kunz i sar, 2009). Dobro je poznato da u prisustvu zajedničkog inflamatornog citokina interferon (IFN)- γ , lokalne antigen prezentujuće ćelije (APC) proizvode interleukin (IL)-12 dovodeći do diferencijacije CD4+T ćelija u T helper tip 1 IFN- γ sekretujuće (Th1) ćelije. Nasuprot tome, u prisustvu IL-4, CD4+ T ćelije se diferenciraju u Th2 ćelije koje proizvode IL-4, IL-5, i IL-13. Snažan ali i slabo regulisan Th1 imunski odgovor je često prisutan u autoimunskim bolestima. Međutim, postoje ubedljivi dokazi za treći efektorski CD4 + Th mehanizam u autoimunitetu. Takozvane Th17 T ćelije proizvode IL-17A i IL-17F, dva citokina koja se ne proizvode od strane Th1 ni Th2 CD4+T ćelija (Kikly i sar, 2006). Kombinacija

transformišućeg faktor rasta (TGF)-1 i IL-6, zajedno sa IL-23 dovodi do proizvodnje ove CD4+ T ćelijske subpopulacije. Nakon IL-23 stimulacije, ovaj novi tip T ćelija proizvodi paletu inflamatornih medijatora, uključujući faktora nekroze tumora (TNF)- α , IL-6, činilac stimulacije kolonija granulocita- makrofaga (GM - CSF).

Prema našim dosadašnjim saznanjima, smatra se da su T ćelije koje proizvode IL-17 odgovorne za mnoge inflamatorne i autoimunske odgovore koji se pripisuju Th1 ćelijama. Pokazano je da su od kliničkog značaja TNF- α u RA, CD i psorijazi, i IL-6 / IL-6R u RA i CD (Fry i Baker, 2007). Nedavno se doslo do novih saznanja o biologiji IL-21 i njegovoj ulozi u patogenezi autoimunskih bolesti (Brennan i McInnes, 2008). Ispitivanja na animalnim modelima autoimunskih bolesti pokazala su da IL-21 igra značajnu ulogu u autoimunosti i ima ulogu zajedničkog modulatora adaptivnog imunskog odgovora prema sopstvenom tkivu u bolestima kao što su RA, SLE, MS, i dijabetesa tipa 1.

1.1.2 Regulatorne T ćelije

Identifikacija regulatornih T ćelija (Treg) promenila je dihotomiju Th1/ Th2 odgovora u patogenezi autoimunskih stanja. Pokazalo se da Th1 ćelije imaju štetnu ulogu u imunopatogenezi nekih autoimunskih bolesti, dok Th2 ćelije ispoljavaju protektivno dejstvo (Jadidi-Niaragh i Mirshafiey, 2011; Vila i Anderson, 2009). Treg suprimiraju različite autoreaktivne odgovore i održavaju autotoleranciju u imunskom sistemu. Od nedavno postoji veliko interesovanje za Treg ćelije, što ih stavlja u centar imunosupresivnih reakcija, jer razumevanje razvoja i funkcije imunoregulacijskih ćelija, od kojih su većina CD4+ T ćelije, može osvetliti etiologiju gubitka autotolerancije (Lan i sar, 2009). Obzirom da osnovnu karakteristiku autoimunskih bolesti kao što je reumatoidni artritis (RA), predstavlja zapaljenje i autoreaktivnost, identifikovanje precizne funkcije ovih ćelija u toku bolesti nam može pomoći u pronalaženju novih terapijskih modaliteta za lečenje RA u budućnosti. Pojam imunosupresije je prvi put opisan 1970 (Gershon i Kondo). Sakaguchi i sar, 1995. godine uvode pojam supresora ili Treg sa povećanom ekspresijom CD25. Od tada, u različitim studijama nastojano je da se otkriju karakteristike i funkcije ovih ćelija u imunskom sistemu i imunopatofiziologiji različitih bolesti kao što su kancer i autoimunske bolesti. Kancer je obično povezan sa povećanjem imunosupresije, dok

kod autoimunskih bolesti, imunosupresija je obično nefunkcionalna. Pored toga, održavanje autotolerancije, u prevenciji nastanka autoimunskog odgovora je veoma važno. Tako Treg su štetne ćelije u patogenezi karcinoma, ali zaštitne ćelije u autoimunskim bolestima. Štaviše, u infektivnim bolestima Treg sa funkcijom ograničavanja inflamatornog odgovora (posebno kod hroničnih infekcija) smanjuju oštećenje tkiva (Belkaid, 2007). Pokazalo se da Treg mogu suprimirati imunske odgovore putem različitih mehanizama, uključujući mehanizme zavisne ili nezavisne od kontakta sa drugim ćelijama (Wan i Flavell, 2008). Pokazano je da prirodne regulatorne T ćelije (nTreg) ispoljavaju svoje supresivne efekte kroz ćelijski-kontakt-zavisne mehanizme preko membranskih molekula dok inducibilne Treg (iTreg) u osnovi koriste kontakt-nezavisne mehanizme koji se zasnivaju uglavnom na produkciji citokina poput IL-10 i transformišućeg faktora rasta (TGF)-beta (Jonuleit i Schmitt, 2003). Iako Treg obično slabo odgovaraju na antigensku stimulaciju ili poliklonalnu aktivaciju in vitro, navodi se da mogu da proliferišu in vivo (Walker et al., 2003). Takodje, smatra se da je mikrosredina u kojoj se nalaze, veoma važan faktor u ispoljavanju njihove funkcije. Danas je poznato da postoje razne podgrupe Treg u imunskom sistemu, uključujući nTreg, CD8 + Treg, TR1 regulatorne ćelije, Th3 ćelije i T ćelije slične NK ćelijama. U drugoj klasifikaciji, Treg su podeljeni u dve podgrupe, prirodni Treg (nTregs) i indukovani Tregs (iTregs). nTreg se razvijaju u timusu tokom procesa selekcije, dok se iTregs razvijaju na periferiji iz naivnih (ili u nekom od stadijuma diferencijacije) T ćelija nakon antigene stimulaciju u specifičnim uslovima (Mills, 2004).

Kao i druge konvencionalne podgrupe T ćelija, Treg takođe doživljavaju proces selekcije u timusu. Njihova selekcija se zasniva na afinitetu TCR prepoznavanja za autoantigene prezentovane od strane antigen-prezentujućih ćelija (APC). Visok afinitet prepoznavanja dovodi do negativne selekcije timocita i klonalne destrukcije pomoću procesa apoptoze, dok slab afinitet prepoznavanja autoantigena dovodi do pozitivne selekcije ovih timocita i njihovog opstanka. Čini se da Treg takođe doživljavaju pozitivnu selekciju u timusu, ali jačina njihovog afiniteta za prepoznavanje autoantigena na antigen-prezentujućim ćelijama je između one koja je potrebna za pozitivnu i negativnu selekciju drugih konvencionalnih T ćelija (Jordan et al., 2001; Kronenberg i Rudensky, 2005). S druge strane, moguće je da postoji posebna faza timocita za nastanak Treg linije limfocita, koja je pre procesa selekcije

pomoću afiniteta za TCR, te je verovatno da je slab afinitet prepoznavanja autoantigena od strane TCR dovoljan za preživljavanje Treg (Pennington i sar., 2006). Pokazano je da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ smanjuje produkciju IL-12 od strane dendritskih ćelija i povećava produkciju IL-10, značajnog u razvoju T regulatornih (Treg) ćelija (Penna i Adorini, 2000).

Tregs potiču iz timusa kao CD4 + ćelija koje ekspiriraju FoxP3+ (engl, forkhead box P3) i visok nivo CD25. Konvencionalne CD4+ T ćelije takođe potiču iz timusa i mogu se diferencirati na periferiji u CD25+FoxP3+ ćelije nakon stimulacije antigenom. FoxP3 je intracelularni Treg- specifičan faktor transkripcije i kontroliše brojne najbitnijih karakteristika Tregs , uključujući represiju transkripcije ključnih efektorskih molekula poput interleukina-2 (IL- 2) i CD127 (Interleukin-7 receptora). FoxP3 je koristan marker za procenu čistoće regulatornih T ćelija, ali obzirom da je intracelularni marker nije pogodan za detekciju u živim ćelijama. Zna se da regulatorne T ćelije ekspiriraju najviši nivo CD25, tako da se strategija razdvajanja CD4+CD25+ koristi za identifikaciju i sortiranja Treg populacije. Dodavanje drugih markera može poboljšati tačnost detekcije populacija od interesa. Poznato je da ekspresija CD127 inverzno koreliše sa ekspresijom FoxP3. Upotreba CD4+CD25+CD127^{low} strategije za izolaciju regulatornih T ćelija rezultirala je višestrukim porastom čistoće i vijabiliteta detektovanih ćelija. Skorašnje studije su pokazale da nTregs imaju veći ekspresiju CD45RO u odnosu na iTregs tako da CD45RO može biti koristan kao marker za izolaciju različitih Treg ćelijskih frakcija od interesa.

1.1.3 Oksidativni stres

Uloga oksidativnog stresa u hroničnoj inflamaciji tkiva (Ku i sar, 2009; Pantovic i sar, 2005) i njegovo mesto u patofiziološkom mehanizmu autoimunskih bolesti (Leitinger, 2008) je odnedavno prepoznata. Smatra se da oksidativni stres igra važnu ulogu u patogenezi autoimunskih bolesti. Utiče na pojačanje zapaljenja, indukuje apoptozu ćelija i narušava imunsku toleranciju. Kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom (RA), sistemskim lupus eritematosusom (SLE) i Sjogrenovim sindromom (SS) dokazano je stanje pojačanog oksidativnog stresa ili smanjenje antioksidantnih kapaciteta.

Oksidativni stres odražava neravnotežu između sistemske proizvodnje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i antioksidantne sposobnost organizma da spremno detoksikuje reaktivne intermedijerne produkte ili da popravi već nastalo oštećenje. Postoje čvrsti dokazi koji podržavaju ulogu oksidativnog stresa u zapaljenju kod bolesnika sa RA i degradaciji hrskavice u eksperimentalnom artritisu (Hassan i sar, 2011). Prooksidacijsko okruženje u RA dovodi do redoks neravnoteže, i posledičnog povećanja proizvodnje reaktivnih kiseoničnih, azotnih i sumpornih jedinjenja (Szabó-Taylor i sar, 2013). To dovodi do stimulacije zapaljensko-proliferativnog odgovora u sinoviji (Hassan i sar, 2011). Malo je dokaza o antioksidativnim svojstvima hormona D3 i njegovih analoga, a neki podaci su čak i kontroverzni. (Deng i sar, 2015; Xu i sar, 2015; Medeiros Cavalcante i sar, 2015). Međutim, pokazano je da kod obolelih od juvenilnog artritisa terapija alfa-kalcidolom značajno moduliše aktivnost enzima antioksidativne zaštite (Radovic i sar, 2012).

1.2 REUMATOIDNI ARTRITIS

1.2.1 Imunska etio-patogeneza reumatoidnog artritisa

Reumatoidni artritis (RA) je hronična, progresivna, inflamatorna autoimunska bolest koja može imati zglobne, vanzglobne i sistemske efekte. Iako neki pacijenti imaju blagu samoograničavajuću bolest, često klinička slika može podrazumevati razaranje zglobova, teške funkcionalne smetnje i udružene komorbiditete (Plenge RM., 2009). Stope smrtnosti su više nego duplo veće kod bolesnika sa RA nego u opštoj populaciji (Wolfe i sar, 1994; Gonzalez i sar, 2007), a izgleda da se ova razlika još produbljuje. Reumatoidni artritis je autoimunsko oboljenje sa veoma kompleksnim patofiziološkim mehanizmima. Genetski faktori kao i faktori spoljašnje sredine igraju važnu ulogu u nastanku ovog oboljenja, koje karakteriše infiltracija sinovije neutrofilima, makrofagima, T i B limfocitima i dendritskim ćelijama. Centralnu ulogu u nastanku ovog oboljenja imaju T ćelije. Pacijenti koji boluju od RA imaju T limfocite koji su usmereni protiv sopstvenog tkiva, i koji usmeravaju imunski sistem u smeru nastanka inflamatorne reakcije u perifernim tkivima.

Najraniji događaj u RA patogenezi je aktivacija urođenog imunskog odgovora, koja obuhvata aktivaciju dendritskih ćelija egzogenim materijama i autologim antigenima

(Smolen i Steiner, 2003). Čelije koje prezentuju antigene, uključujući dendritske ćelije, makrofage i aktivirane B ćelije, prezentuju artritogene antigene T ćelijama. Istovremeno, CD4⁺ T ćelije koje izlučuju interleukin (IL)- 2 i interferon (IFN)-gama infiltrišu sinovijalnu membranu (Smolen i sar, 2007). Jedan od početnih događaja u ovom mehanizmu je aktivacija antigen-specifičnih T ćelija, koje započinju imunski odgovor. Ova aktivacija ima višestruke efekte, uključujući aktiviranje i proliferaciju endotelnih i sinovijalnih ćelija, regrutovanje i aktiviranje proinflammatory ćelija, sekreciju citokina i proteaza od strane makrofaga i fibroblasta poput sinovijalnih ćelija i proizvodnju autoantitela (Harris i Schur, 2007). Ranije je smatrano da je ovaj imunski odgovor isključivo posredovan Th1 ćelijama (Kiran i Debashish, 2008). Međutim, otkrićem Th17 ćelija i njihove funkcionalne povezanosti sa Th1 ćelijama, kao i visokih koncentracija IL-17 u sinoviji pacijenata obolelih od RA, postavlja se nova dilema: da li je RA autoimunsko oboljenje posredovano Th1 ili Th17 imunskim odgovorom, ili u patogenezi učestvuju obe grupe limfocita (Wen i Baker, 2011). B-ćelije doprinose RA patogenezi ne samo preko prezentacije antigena, već i kroz proizvodnju antitela, autoantitela i citokina. Reumatoidni faktor (RF) i anticitrulinska antitela (ACPA) su uobičajena kod bolesnika sa RA. B limfociti ekprimiraju proteine na površini ćelije, uključujući imunoglobuline i antigene diferencijacije poput CD20 i CD22. Autoantitela mogu formirati veće imunske komplekse koji mogu dodatno stimulisati proizvodnju proinflammatory citokina, uključujući faktor nekroze tumora (TNF), preko mehanizma koji podrazumeva aktivaciju Fc-receptora kompleksom (Smolen i sar, 2007). Aktivacija T i B-ćelija uslovljava povećanu produkciju citokina i hemokina, što dovodi do povratne sprege i dodatne interakcije T-ćelija, makrofaga i B-ćelija. Pored prezentacije antigena, makrofagi su uključeni u osteoklastogenezu i predstavljaju glavni izvor citokina, uključujući TNF- α , IL-1 i IL-6. U okviru sinovijalne membrane postoji veliki porast broja aktiviranih sinoviocita koji su slični fibroblastima, i takođe proizvode inflamatorne citokine, prostaglandine i metaloproteinaze. Ovi sinoviociti doprinose uništavanju hrskavice i kosti kako stvaranjem metaloproteinaza u sinovijalnoj tečnosti, tako i direktnom invazijom ovih tkiva (Smolen i sar, 2003). Jedan od ključnih momenata u kaskadi zapaljenja predstavlja pojačanje ekspresije i stvaranja TNF- α (Feldmann i sar, 1996). Na ovaj način dolazi do zapaljenja sinovije i do razaranja zglobova. Povećano stvaranje TNF- α ima nekoliko uzroka, uključujući interakciju između T i B limfocita, sinovijalnih

ćelija sličnim fibroblastima i makrofaga. Ovaj proces vodi ka hiperprodukciji mnogih citokina poput interleukina 6, koji takođe uzrokuje dugotrajnu inflamaciju i posledičnu destrukciju zgloba (Choy i sar, 2002).

1.2.2. Kliničke manifestacije i procena aktivnosti RA

Reumatoidni artritis (RA) je hronična zapaljenska i destruktivna bolest zglobova čija je prevalencija oko 0,5-1% stanovništva u industrijskom svetu i često dovodi do značajnog invaliditeta i smanjenja kvaliteta života (Smolen i Steiner, 2003). Dva do tri puta je češća kod žena nego kod muškaraca, a može da počne u bilo kom dobu života, sa maksimalnom učestalošću između četvrte i šeste decenije života. Pored otoka i bola zglobova izazvanih inflamatornim procesom, u odmaklim fazama RA dolazi do destrukcije zgloba.

Početak bolesti je obično postepen i nespecifičan, Zglobne i periartikularne manifestacije uključuju otok zglobova i osetljivost na palpaciju, jutarnju ukočenosti i otežanu pokretljivost zahvaćenih zglobova. Klinička prezentacija RA je različita, ali pojava bola sa simetričnim otokom malih zglobova je najčešći nalaz. Početak RA je akutan ili subakutan u oko 25 % pacijenata, ali može da se javi i kao kao palindromska bolest, monoartikularna bolest, da se prezentuje vanzglobnim sinovitisom (tenosinovitis, bursitis), i opštim simptomima (malaksalost, umor, gubitak težine, povišena temperatura). RA se manifestuje kao poliartritis, to jest, zahvata veći broj zglobova, iako u ranim stadijumima bolesti, može biti zahvaćen samo jedan ili nekoliko zglobova. Praktično, bolest može zahvatiti sve periferne zglobove. Međutim, najčešće zahvaćeni zglobovi su zglobovi ruku, stopala i kolena, ali su obično distalni interfalangealni zglobovi pošteđeni. Pored toga, RA može zahvatiti kičmu, i često atlanto- aksijalni zglob u kasnijim fazama bolesti što predstavlja direktni uzrok smrtnosti povezan sa zahvatom zglobova. Vanzglobna progresija bolesti je još jedna osobina RA, koja se može ispoljiti različito, od prisustva reumatoidnih čvorića, hematoloških abnormalnosti, visceralnog zahvata pa do opasnih životno-ugrožavajućih vaskulitisa. Umor, groznica, gubitak težine, slabost i malaksalost česti

su klinički znaci koji mogu biti povezani sa manifestacijama vanzglobnog reumatizma. Trenutno važeći dijagnostički kriterijumi za RA su ACR/EULAR iz 2010. Definitivna dijagnoza RA se može postaviti kada je ukupni ACR/EULAR zbir ≥ 6 ((Neogi i sar, 2010).

1.3. VITAMIN D - HORMON D

Vitamin D i njegovi analogi su u fokusu sve većeg broja studija proteklih godina, pokazujući svoju funkciju ne samo u metabolizmu kalcijuma i formiranja kostiju, već i u interakciji sa imunskim sistemom, što nije iznenađujuće, jer vitamina D receptor (VDR) postoji u različitim tkivima, poput mozga, srca, kože, creva, gonada, prostate, grudi, i imunskim ćelijama, kao i u kostima, bubrezima i paratireoidnim žlezdama (Jones i sar, 2008). Nekoliko skorijih studija je pokazalo povezanost nedostatka vitamina D sa nekim od autoimunskih poremećaja, uključujući insulin-zavisan diabetes melitus (IDDM), multiplu sklerozu (MS), inflamatornu bolest creva (IBD), sistemski lupus eritematosus (SLE) i reumatoidni artritis (Kamen i sar, 2006; Lipps, 2004). U svetlu ovih rezultata, smatra se da je vitamin D spoljašnji faktor sposoban da utiče na nastanak autoimunskih bolesti (Cantorna i Mahon, 2004).

Dugi niz godina se verovalo da su regulacija homeostaze kalcijuma u organizmu i pozitivan uticaj na promet kosti jedine ili ključne uloge ovog hormona i razlog zašto se smatra neophodnim za zdravlje kostiju. Ovo je svakako tačno, ali se sada zna da su mnoga tkiva, naročito makrofagi u svim tkivima i raznim epitelima, sposobna da eksprimiraju 1α -hidroksilazu i sintetisu aktivni D hormon lokalno (Adams i Hewison, 2010). D hormon sintetisan lokalno u tkivima ili prisutan u krvi deluje na brojne ćelija i tkiva u organizmu, endokrino, autokrino i parakrino, i služi kao veza između ekstraćelijskih stimulusa i genomskih odgovora (Mora i sar, 2008). Po pravilu, efekti D hormona na imunski sistem zapravo predstavljaju promenu urođenog imuniteta povezanog sa regulacijom stečenog imuniteta (Adorini i Penna, 2008). Veza između nedostatka vitamina D i rasprostranjenosti nekih autoimunih bolesti kao što su IDDM, MS, RA, SLE i IBD je potvrđena (Ruiz-Irastorza i sar, 2008). Takodje smatra se da

vitamin D i njegovi analozi ne samo sprečavaju nastanak autoimunih bolesti, već se takođe mogu koristiti i u njihovom lečenju (Szodoray i sar, 2008). Suplementacija holekalciferolom (vitaminom D) ili kalcitriolom (D hormon) je pokazala terapijski efekat u različitim eksperimentalnim životinjskim modelima, kao što su alergijski encefalomijelitis, kolagenom indukovani artritis, dijabetes melitus 1, inflamatorna bolest creva, autoimuni tiroiditis, i SLE (Arnson i sar, 2007). Niski nivoi vitamina D u serumu osim sa nutritivnim statusom, takođe mogu biti povezani sa drugim faktorima kao što su smanjenje fizičke sposobnosti, smanjena izloženost suncu, povećana učestalost polimorfizama VDR gena, kao i neželjena dejstva lekova (Leventis i Patel, 2008; Szodoray i sar, 2008).

1.3.1. Vitamin D i reumatoidni artritis

Obrazloženje za povezanost nedostatka vitamina D i RA zasniva se na dve činjenice: dokazi ukazuju na to da pacijenti sa RA imaju manjak vitamina D i prisustvo 1,25 (OH)₂D₃ i VDR u makrofazima, hondrocitima, i sinovijskim ćelijama u zglobovima (Nagpal i Na, 2005; Manolagas i sar, 1986). Odnos između polimorfizama BsmI gena za VDR i aktivnosti RA pokazan je u studiji u kojoj su pacijenti sa BB ili Bb genotipovima imali veći HAQ indeks, brzinu sedimentacije eritrocita (ESR), kumulativnu dozu kortikosteroida, i veći broj lekova koji modifikuju tok bolesti (DMARD) u odnosu na pacijente sa bb genotipom (Gomez-Vaquero i sar, 2007). U modelima kolagenom indukovanih artritisa, suplementacija kroz ishranu ili oralno davanje vitamina D sprečilo je razvoj ili odložilo progresiju artritisa (Tsuiji i sar, 1994). Nedavno je ispitivana udruženost između izloženosti UVB zračenju i rizika za pojavu RA kod žena u dve velike prospektivne studije The Nurses' Health Study (NHS) i NHS II. Studije su potvrdile da je značajno smanjenje rizika za RA povezano sa dužim izlaganjem UVB zračenju (Arkema i sar, 2013). Slično tome, studija na 29.386 žena je pokazala da je rizik od razvoja RA obrnuto proporcionalan većem unosu vitamina D (Merlino i Curtis, 2004). Međutim, u drugoj velikoj prospektivnoj studiji koja je pratila 186,389 žena od 1980. do 2002. godine, veza između povećanog uzimanja vitamina D i rizika od razvoja RA ili SEL nije pokazana (Costenbader i sar, 2008). Slično tom rezultatu, studija koja je pratila serumski nivo vitamina D kod 79 davalaca krvi nije pokazala postojanje razlike između bazalnih nivoa vitamina D kod pacijenata

koji su kasnije razvili RA i kontrolne grupe (Nielen i sar, 2006). Svi ovi nalazi pokazuju da je ovo još uvek veoma kontroverzna tema, i nema konsenzusa među autorima o definitivnoj vezi između nivoa vitamina D i RA. Izgleda takođe da postoji inverzan odnos između aktivnosti bolesti i serumske koncentracije vitamina D kod pacijenata sa aktivnim artritismom. Pokazana je negativna korelacija između nivoa 25 (OH) D vitamina i broja bolnih zglobova, DAS28 i HAQ. Za svako povećanje za 10 ng/ml nivoa vitamina D u serumu je vrednost DAS28 bila manja za 0.3 i nivo CRP-a za 25% (Patel i sar, 2007).

1.3.2. Fiziološka regulacija i sinteza D hormona

Hormon D je steroidni hormon čija je glavna funkcija regulisanje homeostaze kalcijuma kao i formiranje i reapsorpcija kosti, kroz interakciju sa paratiroidnim žlezdama, bubrezima i crevima (Arnson i Amital, 2007). Nakon izlaganja ultraljubičastom zračenju, prekursor vitamina koji se nalazi u koži, D,7-dehidroholesterol, prolazi kroz fotohemijsko razdvajanje što ga pretvara u previtamin-D3. Tokom narednih 48 sati, ovaj molekul podvrgava se temperaturno zavisnom molekularnom rearanžmanu, što rezultira formiranjem vitamina D3 (holekalciferola). U jetri u reakciji posredovanoj enzimom koji je sličan citohromu P450 (CYP), vitamin D se hidrosilira i konvertuje u 25-hidroksivitamin D [25 (OH) D], najzastupljeniju formu u cirkulaciji koja je biološki neaktivna (Bringhurst i sar., 2008). 25(OH)D forma je stabilni metabolit vitamina D u serumu sa snažnim afinitetom za vitamin D-vezujući protein (VDBP) i druge proteine iz familije albumina. Kao takav, nivo 25(OH)D u serumu je najbolji pokazatelj nivoa vitamina D, bilo sintetisanog u koži bilo unetog putem ishrane. Ipak, ovaj oblik još uvek nije hormon; to je prehormonalni oblik prirodnog hormona i nema skoro nikakvu biološku aktivnost u telu. Kalcidiol (25(OH)D) se zatim transportuje kroz krvotok do ćelija proksimalnog tubula bubrega, gde se dodatnom hidroksilacijom u 1 α poziciji pod dejstvom enzima 25-hidroksivitamin D-1 α -hidroksilaze (CYP27B1) hidrosilira i formira konačni biološki aktivni oblik D hormona kalcitriol (1 α ,25(OH)₂D₃). Aktivnost ovog enzima povećava paratiroidni hormon (PTH) koga sekretuju paratiroidna žlezde. On predstavlja ključni aktivator CYP27B1 enzima u ćelijama proksimalnog tubula (Jurutka i sar, 2007). Nakon toga, kalcitriol postaje pravi D

hormon sa potpunom biološkom aktivnošću koja je slična drugim steroidnim hormonima.

Takodje hidroksilacija vitamina D se vrši i van bubrega, stvarajući hormon D čiji autokrini i parakrini efekti podrazumevaju sprečavanje ćelijske proliferacije, promociju diferencijacije ćelija, i imunoregulaciju. Dakle, 1α -hidroksilaza koja pretvara $25(\text{OH})\text{D}$ u njegovu aktivnu formu eksprimirana je ne samo u bubregu, već i u aktiviranim makrofagima, monocitima, dendritskim ćelijama, i drugim tkivima (Fritsche i sar, 2003; Monkawa i sar, 2000). Aktivnost bubrežne 1α -hidroksilaze zavisi od uzimanja kalcijuma i fosfata, cirkulišuceg nivoa metabolita $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i paratiroidnog hormona (PTH) i fiziološki se smanjuje tokom starenja. S druge strane, ekstra-renalna regulacija hidroksilaze određena je lokalnim faktorima, kao što su proizvodnja citokina i faktora rasta, stepen zrelosti dendritskih ćelija (Hewison i sar, 2003) kao i nivo $25(\text{OH})\text{D}$, što je čini najosetljivijim mehanizmom u uslovima nedostatka vitamina D.

Da bi se utvrdilo da li je adekvatan nivo vitamina D, treba meriti koncentraciju $25(\text{OH})\text{D}$, glavnog cirkulišuci oblik ovog vitamina, sa vremenom poluraspada od oko dve nedelje. Potrebno je naglasiti da je merenje nivoa $25(\text{OH})\text{D}$ (kao jedinog standardizovanog alata za procenu statusa vitamina D) zapravo samo odraz ravnoteže između unosa vitamina D hranom i/ili suplementacijom i njegovog korišćenja u lokalnim tkivima kao aktivnog D hormona (posebno imunskim ćelijama u stanju hronične inflamacije). Ovo je verovatno najbolje objašnjenje za brojne kliničke i epidemiološke studije koje su pokazale vezu između niskog statusa vitamina D i brojnih autoimunskih i malignih bolesti (Cutolo i sar, 2011; Bjelakovic i sar, 2011).

1.3.3 Vitamin D receptor (VDR) i mehanizam delovanja hormona D

Steroidni hormoni su među osnovnim signalnim molekulima u prirodi i odgovorni su za regulisanje razvoja, metabolizma reprodukcije, i odgovora na stimulse iz okoline (Margolis i Christakos, 2010). Gen za VDR je kloniran i okarakterisan kao nuklearni receptor za $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, skoro 20 godina posle kloniranja receptora za sve ostale nuklearne hormone, poput estradiola, testosterona, kortizola i retinoične kiseline. Utvrđeno je da ovi receptori (estrogen receptor (ER), receptor progesterona, receptor androgena (AR), receptor glukokortikoida, tireoidni receptor i VDR) pripadaju istoj

super familiji ligand-aktiviranih faktora transkripcije. Signalni put steroidnih hormona je preko ćelijskih i nuklearnih hormonskih receptora koji odgovaraju hormonima na osnovu steroidne strukture (Lonard i sar, 2007). To je od suštinskog značaja jer svi ovi hormoni utiču na formiranje kostiju i imunoregulaciju. Steroidni jedarni receptori, kada se za njih veže agonista hormona, vežu se za hromatin preko vitamin D-reagujućih elemenata i tako utiču na ekspresiju regulatornih gena, posreduju u remodelovanju hromatina, epigenetskim modifikacijama, recikliranju receptora, i konačno ekspresiji gena (Lonard i sar, 2007). Poznato je da samo $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and VDR agonisti imaju visok afinitet da se vežu za VDR (Eduardo-Canosa i sar, 2010) i, kada se vežu, grade heterodimer sa X receptorom retinoične kiseline. Nakon toga, ovaj kompleks se vezuje za vitamin D-reagujući element i deluje kao transkripcioni faktor koji stimuliše ili blokira transkripciju gena (Norman, 2006). Procenjuje se da je više od 2000 gena direktno ili indirektno kontrolisano od strane ovog transkripcionog kompleksa (Nagpal i sar, 2005).

Dakle, vitamin D ispoljava svoju biološku aktivnost vezivanjem za nuklearni receptor, vitamin D receptor (VDR), koji, slično receptorima steroidnih hormona, tireoidnih hormona i retinoida, reguliše transkripciju DNK u RNK. Ovi receptori su eksprimirani od strane različitih ćelija, uključujući epitelne ćelije tankog creva i bubrežnih tubula, osteoblaste, osteoklaste, hematopoetske ćelije, limfocite, ćelije epiderma, ćelije pankreasa, miocite i neurone (Szodoray i sar, 2008). Od nedavno, poznate su i uloge Vitamina D posredovane VDR, kao što su ćelijska proliferacija i diferencijacija, kao i imunomodulacija. Vitamin D receptor široko je eksprimiran u većini imunskih ćelija, uključujući monocite, makrofage, dendritske ćelije, NK ćelije, i T i B limfocita (Nagpal i Na, 2005). Međutim, njegova ekspresija je veća u nezrelim imunskim ćelijama u timusu i nezrelim CD8-limfocitima, nezavisno od njihovog statusa aktivacije. Poznato je da je VDR gen najviše eksprimiran u metaboličkim tkivima, kao što su bubrezi, kosti, i creva, ali i nisko do umereno eksprimiran u gotovo svih 250 drugih različitih humanih tkiva. Uloge $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, kao što je njegova uloga u homeostazi kalcijuma i koštanoj mineralizaciji, ali i njegova regulatorna uloga na nivou ćelija imuniteta, posredovane su genskim regulatornim mehanizmima VDR-a (Carlberg i Molnar, 2012). Ovo je glavni mehanizam kojim D hormon ispoljava endokrine efekte unutar celog organizma. Za razliku od drugih

nuklearnih receptora za steroidne hormone, postoji samo jedan gen koji kodira VDR receptor. VDR gen se nalazi na hromozomu 12 (12q13.11), a pokazano je da polimorfizmi BsmI, ApaI, TaqI and FokI mogu biti povezani sa prisustvom i/ili težinom mnogih reumatskih oboljenja (Ranganathan, 2009; Maalej i sar, 2005). Čini se da sam VDR gen može da utiče na neke hronične bolesti a VDR-vezani agonisti mogu da utiču na ekspresiju i aktivnost brojnih gena. Iako je VDR jedarni transkripcioni faktor, VDR protein u citosolu je povezan sa sarkoplazmatskim retikulumom i Ca^{2+} -ATPazom u plazmamembrani, što može objasniti neke od brzih, negenomskih dejstava $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, kao što je preuzimanje kalcijuma (Huhtakangas i sar, 2004).

Poslednja decenija bi mogla da bude imenovana za epigenetsku eru znanja, jer su brojne studije pokazale da su epigenetski procesi odgovorni za tkivno-specifičnu gensku ekspresiju tokom diferencijacije i mogu da igraju ključnu ulogu u adaptivnim imunskim mehanizmima. Regulacija gena, pod uticajem VDR- agonist kompleksa, je modulirana dvostrukom modifikacijom histona, acetilacijom i DNK metilacijom. implicirajući na taj način D hormon i sintetičke agoniste VDR kao moćne genetske i epigenetske regulatore (Hosseini-Nezhad i Holick, 2012). Jedro ćelije je kompleks genomske DNK i nukleozoma, naziva se hromatin, i sprečava pristup DNA-vezujućih proteina, kao što su faktori transkripcije, njihovim ciljnim mestima u genomu. (Razin, 1998) Ovaj hromatinski potencijal je bitan za dugotrajnu regulaciju, poput terminalne diferencijacije ćelija.

Epigenetski promene sastoje od naslednih modifikacija DNK na osnovu reverzibilne posttranslacione modifikacije histon proteina, poput acetilacije i metilacije, koje su uslovljene klasom koregulatornih proteina sa aktivnošću histon acetiltransferaze, histon deacetilaze (HDAC), histon metiltransferaze ili demetilaze (Narlikar i sar, 2002; Vojinovic and Damjanov, 2011). VDR vezan za njegov ligand (agonist) inicira stvaranje kompleksa između nuklearnih receptora i koaktivatora gena, što dovodi do lokalnog otvaranja hromatina, i indukuje mRNK sintezu ciljnih gena putem proteina medijatora i faktora transkripcije. Naprotiv, ako su samo VDR u kontaktu sa korepresorima i HDAC, oni će lokalno potisnuti hromatin i inaktivirati ciljne gene. (Takeyama i Kato, 2011). Čini se da je to glavni mehanizam kojim D hormon reguliše ekspresiju gena i brojne inflamatorne reakcije u organizmu. Visok epigenetski

potencijal VDR agonista čini ih poželjnim terapijskim pristupom u brojnim inflamatornim i malignim oboljenjima.

1.3.4 “Vitamin D” – steroidni imunomodulatorni hormon

Vezivanjem vitamina D za receptor (VDR), lipid-rastvorljivi aktivni $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reguliše niz gena, mnoge uključene u inflamaciju i odgovore stečenog i urođenog imunskog sistema (Arnson i Amital, 2007; Cantorna, 2004; Hayes i sar, 2003; Griffin i sar, 2003). Pokazan je visok nivo ekspresiranosti VDRa se u dendritskim ćelijama, T i B limfocitima, i makrofazima. Na funkciju ovih ćelija veoma utiče vezivanje aktiviranog $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Jones i sar, 1998; Canning i sar, 2001; Gauzzi i sar, 2005). Ekspresija VDRa na neaktivnim CD4-T ćelijama povećava se 5 puta sa aktivacijom T-ćelija (Mahon i sar, 2003). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibira ekspresiju IL-2, važan faktor rasta za T limfocite, i potiskuje lučenje Th1 citokina IL-12, interferon- γ , i TNF, povećavajući IL-4, IL-5 i IL-10, što dovodi do razvoja Th2 T-ćelijske populacije (Penna i Adorini, 2000). Dodavanje $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ CD4-T ćelijama takođe inhibira ekspresiju IL-6, kofaktora stimulacije Th17 ćelija, važnih u nastanku autoimunosti (Stockinger, 2007). Kada se in vitro doda B ćelijama pacijenata obolelih od sistemskog eritemskog lupusa (SLE), $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibira produkciju autoantitela (Linker-Israeli i sar, 2001). In vitro, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibira diferencijaciju monocita u dendritske ćelije i blokira stimulatívne efekte koje T ćelije imaju na njih (Griffin i sar, 2001). Umesto toga, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promoviše diferencijaciju monocita u makrofage, tako što sprečava oslobađanje inflamatornih citokina (Helming i sar, 2005), i smanjuje njihovu sposobnost da predstave antigene limfocitima nishodnom regulacijom ekspresije MHC II molekula na površini ćelije (Lemire, 1992).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR transkripciona signalizacija takođe ispoljava antiinflamatorno dejstvo preko nishodne regulacije prostaglandinskog puta ciklooksigenaze-2 (Moreno i sar, 2005). Takođe idukuje toleranciju jer dovodi do diferencijacije CD4+T ćelija u T regulatorne ćelije koje proizvode IL-10, i suprimira proliferaciju responderskih T ćelija (Unger i sar, 2009). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stupa u interakciju sa VDR receptorima na osteoblastima, stimulišući ekspresiju liganda receptora aktivatora nuklearnog faktora κB (27). Nezrele dendritske ćelije koje su diferencirane iz monocita u prisustvu

1,25(OH)₂D₃ reaguju neadekvatno na inflamatorne hemokine koji regulišu sazrevanje dendritskih ćelija i njihovu migraciju u limfne čvorove (Gauzzi i sar, 2005).

Obzirom da dendritske ćelije imaju centralnu ulogu u održavanju kako imuniteta kao zaštitnog mehanizma tako i autotolerancije (Lanzavecchia i Sallusto, 2001), uticaj vitamina D na njihovo sazrevanje i funkciju može imati za posledicu razvoj i / ili progresiju autoimunskih bolesti. Međutim, kako je sama patogeneza autoimunskih bolesti još uvek nejasna, mnogi putevi koji su uključeni ukazuju na potencijalnu ulogu insuficiencije vitamina D u progresiji bolesti, mada nije jasno koju ulogu igra unos vitamina D ili njegov nedostatak u aktiviranju autoimunske bolesti. In vivo, suplementacija sa 1,25(OH)₂D₃ prevenira razvoj inflamatornog artritisa, autoimuskog encephalomijelitisa (model za MS), dijabetesa tipa I i autoimuskog tiroiditisa u eksperimentalnim animalnim modelima (Lemire i Archer, 1991; Cantorna i Hayes, 1998; Zella i McCary, 2003; Cantorna i Hayes, 1996). Miševi sa genetski modifikovanim nedostatkom Vitamin D receptora (knock-out miševi) razvijaju proliv, rektalno krvarenje, značajni gubitak telesne težine, što dovodi do letalnog ishoda u okviru 2 nedelje. Stoga se smatra da vitamin D deficiencija kompromituje mukozne barijere, povećava osetljivost mukoze na oštećenja i povećava potencijalni rizik od nastanka inflamatorne bolesti creva (Kong i sar, 2008). Navedeni dokazi pokazuju da vitamin D igra važnu ulogu u regulaciji imunskog sistema i, verovatno, u modulaciji imunološki posredovanih bolesti (Diniz i sar, 2010).

Slične osobine i mehanizam delovanja pokazuju glikokortikoidi čiji su sintetski analozi najčešće prepisivani lekovi u lečenju inflamatornih stanja i autoimunih bolesti kao što su: reumatoidni artritis, multipla skleroza, sistemski lupus erytematosus (Gross i Cidlowski 2008).

Glukokortikoidi (GK) spadaju u grupu steroidnih hormona. koje stvara kora nadbubrežne žlezde. Pored brojnih funkcija u metabolizmu, razviću, funkcijama niza organa i sistema, glukokortikoidi imaju značajnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora. Poremećaji u njihovoj produkciji i delovanju predstavljaju endokrinu osnovu brojnih inflamatornih i autoimunskih bolesti, pa stoga i njihovi sintetski analozi imaju veoma široku primenu u terapiji inflamatornih i autoimunskih oboljenja (De Bosscher i Haegeman.2008). Naime, davne 1949 godine, Hench i njegove kolege su prvi put primenili glukokortikoid kortizon kao lek za reumatoidni artritis (Hench i Kendall, 1949) i od tada do danas glukokortikoidi se primenju u lečenju autoimunskih

i inflamatornih oboljenja kao što su: multipla skleroza, astma, reumatoidni artritis, inflamatorne bolesti creva i druge bolesti uslovljene ili praćene inflamacijom (Boumpas i sar.1993).

Većinu svojih mnogobrojnih antiinflamatornih i imunosupresivnih efekata GK obavljaju vezujući se za citoplazmatski glukokortikoidni receptor (GR). Zahvaljujući svojoj lipofilnoj strukturi, glukokortikoidi lako prolaze kroz ćelijsku plazma membranu i vezuju se visokim afinitetom za ligand-vezujući domen GR što rezultira oslobađanjem samog receptora iz multiproteinskog kompleksa (Almawi i sar,1996). Nakon translokacije u jedro GR se vezuje za specifične nukleotidne DNK sekvence nazvane glukokortikoid-odgovarajući elementi (eng. *glucocorticoid response elements*, GRE) (Berg, 1989). Sam broj i lokalizacija GRE određuje nivo transkripcione indukcije. Kao što je poznato, transkripcioni faktori su proteini i vezuju se za regulatorne sekvence odgovarajućih gena čime povećavaju ili smanjuju nivo genske transkripcije. Stoga i GR koji je vezao GK predstavlja transkripcioni faktor. Kao takav, GR ostvaruje transaktivaciju tj. povećanje transkripcije specifičnih gena, bilo direktno stabilizacijom transkripcionih kompleksa ili indirektno, delovanjem na hromatinske strukture, čime omogućavaju vezivanje transkripcionih faktora i samu inicijaciju transkripcije. Pored transaktivacije GK svoje dejstvo ostvaruju i putem transrepresije. Transrepresija se odnosi na dejstvo GK koje ostvaruju preko negativnih GRE. Proinflamatorni citokini kao što su IL-1 i IFN- γ su posebno osetljivi na ovaj vid steroidne inhibicije (Barnes i Adcock. 1993). Naime, GR za koji je već vezan glukokortikoid ima mogućnost da direktnim ili indirektnim interakcijama inhibira transaktivacionu funkciju transkripcionih faktora kao što su aktivacioni protein 1 (AP1) i NF κ B. Jedan od načina je i vezivanje kompleksa GK-GR za vezujuću subjedinicu transkripcionih faktora i na taj način sprečava njihovu asocijaciju za molekul DNK (Song i sar, 2005; De Bosscher i sar, 2000). Većinu svojih antiinflamatornih i imunosupresivnih efekata GK ostvaruju putem ove transrepresivne aktivnosti koja posledično dovodi do inhibicije sinteze prostaglandina i proinflamatornih citokina kao što su IL-1, IL-2, TNF, IFN- γ i drugih proinflamatornih medijatora (Schäcke i sar, 2006). Uprkos tome što je poznato da je za inhibiciju sinteze proinflamatornih citokina i prostaglandina neophodno vreme i da je ona izražena tek nakon nekoliko sati, zapaženo je da antiinflamatorna i imunosupresivna

dejstva mogu nastupiti veoma brzo i tada se ne mogu objasniti genomskim delovanjem (Croxtall i sar, 2000).

Pored genomskog efekta glukokortikoida danas je sve više podataka koji ukazuju da GK svoj efekat mogu da ostvare i mimo genoma. Naime, rezultat ovog negenomskog efekta je veoma brz i ne odigrava se na transkripcionom nivou. Do sada opisana su tri načina brzog, ne-genomskog delovanja glukokortikoida: a) Fizičko-hemijske interakcije na nivou ćelijske membrane (Buttgereit i Scheffold, 2002), b) Efekat posredovan citoplazmatskim GR (Croxtall i sar, 2000), c) Efekat posredovan membranskim GR (Bartholome i sar, 2004).

Glukokortikoidi ispoljavaju značajna antiinflamatorna i imunosupresivna dejstva koje ostvaruju na krvnim sudovima, ćelijama i medijatorima zapaljenske i imunske reakcije (Barnes, 2006). Glukokortikoidi blokiraju sve tipove zapaljenskih reakcija tako što stabilizuju membrane lizozoma, smanjuju propustljivost kapilara, i inhibiraju sintezu arahidonske kiseline i njenih metabolita (prostaglandina i leukotriena), faktora aktivacije trombocita (PAF), faktora nekroze tumora (TNF), interleukina (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN- γ kao i faktora inhibicije migracije makrofaga (MIF) (Rhen i Cidlowski 2005; Barnes, 2006). Svoj imunosupresivni efekat glukokortikoidi ostvaruju i indukcijom apoptoze kako nezrelih T limfocita unutar timusa tako i zrelih T limfocita na periferiji (Michailowska-Wender i Wender, 2008).

Svi navedeni efekti glukokortikoidnih hormona pružaju mnogobrojne mogućnosti za njihovu farmakološku primenu.

1.4. VITAMIN D RECEPTOR (VDR) AGONISTI

Otkriće imunomodulatornih genetskih i epigenetskih efekata i antitumorskih svojstava D hormona navelo je istraživače da ispituju mogućnost njegovog korišćenja kao terapijskog sredstva za različite autoimunske i maligne bolesti (De Luca, 2004; Andjelkovic i sar, 1999; Antico i sar, 2012). Imunomodulatorna svojstva D hormona ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) se uglavnom postižu samo ukoliko se koriste vrlo visoke doze, odnosno , potrebno je da D hormon kao prirodno jedinjenje bude prisutan u visokim koncentracijama u ćelijama i u tkivima, što može izazvati hiperkalcemiju kao

neželjeni efekat. U poslednjih nekoliko godina sprovedena su mnoga istraživanja sa ciljem da se sintetišu 1,25(OH)₂D₃ analozi (vitamin D receptor (VDR) agonisti) sa istom biološkom aktivnošću i čak jačim antiinflamatornim potencijalom, ali manjim kapacitetom za nastanak hiperkalcemije (Adorini, 2002). Do sada je sintetisano više od tri hiljade analoga D hormona (agonista), od kojih većina ima modifikaciju u svom alifatičnom bočnom lancu (Carlberg, 2003). Razvoj agonista se zasniva na poznavanju specifičnosti biohemijskih mehanizama VDR vezivanja sa prirodnim D hormonom ili njegovim analogima (VDR agonisti). Vezivanje je rezultat specifičnih interakcija D hormona ili njegovih agonista sa ligand-vezujućim mestom unutar ligand-vezujućeg domena (LBD) u VDR. LBD je član familije visoko konzerviranog proteina DNK-vezujućeg domena (DBD) i predstavlja kompleksnu strukturu kada se veže za VDR. Biohemijskim i biofizičkim metodama je dokazano da postoji značajna stabilizacija LBD u prisustvu specifičnog liganda, čime se postiže kompaktnija i stabilna struktura. (Chawla, 2001)

Prirodni D hormon kao specifični ligand, vezuje se preko interakcije njegove tri hidroksilne grupe sa parom aminokiselina unutar tercijarne strukture formiranog kompleksa sa LBD. U kompleksu VDR-LBD, A-prsten D hormona ili njegovog agoniste usvaja α -stoličastu konformaciju sa 1-OH i 3-OH grupama u ekvatorijalnoj i aksijalnoj orijentaciji (Bouillon i sar, 1995). Ovo je verovatno razlog što VDR agonisti sa OH grupom u položaju 1 imaju najveću specifičnost vezivanja za VDR (Richy i sar, 2004). Većina analoga D hormona (VDR agonisti) ima samo manje izmene u odnosu na prirodni hormon koji ima istu sekosteroidnu strukturu i formiraju istu agonist-VDR konformaciju. Ipak, postoji nekoliko različitih grupa analoga koji se mogu uslovno podeliti na steroidne i nesteroidne (Schacht i Ringe, 2012; Vojinović, 2014).

Alfakalcidol je prvi sintetisan analog D hormona kome za razliku od prirodnog hormona jedino nedostaje 25(OH) grupa. Inače, alfakalcidol se kao registrovan lek, decenijama unazad efikasno koristi u sklopu lečenja primarne i glikokortikoidima indukovane osteoporoze. Pokazani su njegovi pozitivni efekti na aktivnost bolesti i komponente imunskog odgovora kod bolesnika sa aktivnom reumatoidnim artritisom. (Yamauchi i sar, 1989; Anđelkovic i sar, 1999; Hein i Oelzner, 2000). Najčešće se koristi kod pacijenata sa terminalnom bubrežnom bolesti, obzirom da osobe sa

oštećenom bubrežnom funkcijom nemaju sposobnost za efikasnu drugu hidroksilaciju potrebnu za formiranje fiziološki aktivnog oblika hormona D.

Alfacalcidol zaobilazi endogenu regulaciju bubrežne $1\text{-}\alpha$ hidroksilaze te se njegov farmakokinetički profil zbog toga veoma razlikuje od kalcitriola: posle oralne ingestije kalcitriola, maksimalna serumska koncentracija $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se postiže unutar 2 sata, dok oralna primena alfacalcidola uzrokuje spor rast nivoa serumskog kalcitriola sa maksimalnom serumskom koncentracijom posle 8-18 sati. Kalcitriol, nakon apsorpcije, deluje odmah i direktno na VDR u ćelijama intestinalne sluzokože promovišući apsorpciju kalcijuma i dovodeći do brzog porasta nivoa serumskog kalcijuma. Nasuprot tome, alfacalcidol ima ograničene efekte na nivou intestinalne apsorpcije, obzirom da 25-hidroksilaza potrebna za njegov metabolizam u kalcitriol deluje uglavnom u jetri. U poređenju sa kalcitriolom, alfacalcidol omogućava i dužu i stabilniju i proizvodnju kalcitriola uz manji rizik od hiperkalcemije (Richy i sar, 2004).

Kada se želi postići snažan i bezbedan efekat VDR agonista, povoljna farmakokinetika alfacalcidola je svakako preporuka da se ovaj VDR agonist upotrebi umesto kalcitriola, jer redukuje pojavu nepoželjnih skokova serumskog kalcijuma. Naime, vreme utrošeno za postizanje maksimalne koncentracije hormona D u plazmi smanjeno je za 50% i skoro je dva puta duže posle oralne i i.v. primene $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ nego nakon slične primene kalcitriola kod zdravih dobrovoljaca. Dokazan je znatno manji pik koncentracije $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nakon oralne primene $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ nego posle oralne primene slične doze $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Ohno i sar, 1982; Seino i sar, 1987; Nagant de Deuxchaisnes i sar, 1991) . Povećanje maksimalne koncentracije $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ je potvrđeno posle i.v. primene rastućih doza $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ (Papapoulos i sar, 1988), ali je dostignuti nivo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i dalje bio znatno niži, od onog koji je postignut nakon i.v. primene manjih doza $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Slatopolsky i sar, 1984). Poznato je da se alfacalcidol, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, hidroksiliše u $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ u jetri i u ovim starim istraživanjima se smatralo da alfacalcidol ostvaruje svoj efekat samo ukoliko se transformise u $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Medjutim, novija istraživanja su pokazala da sam alfacalcidol ima visok afinitet vezivanja za VDR čime se može objasniti nizak nivo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nakon i.v. ili oralnog davanja jer veliki procenat leka se direktno vezuje za VDR i ne transformise u kalcitriol.

U otvorenoj studiji sa 19 pacijenata obolelih od RA, koji su bili tretirani tradicionalnim DMARD, uz oralnu dopunu visokim dozama alfa-kalcidola za tri meseca je smanjena težina simptoma kod 89% pacijenata, od kojih je 45% postiglo kompletnu remisiju i 44% imalo zadovoljavajuće rezultate. Nije primećena veća učestalost sporednih efekata, kao što je hiperkalcemija (Andjelkovic i sar, 1999).

Brojnim eksperimentalnim studijama na životinjskim modelima koje su istraživale terapijske mogućnosti i sigurnost brojnih različitih agonista VDR, dobijeni su obećavajući rezultati. Preventivne i terapijske mogućnosti VDR agonista su pokazane u životinjskim modelima sistemskog eritemskog lupusa, u MRL-lpr / lpr miševa, eksperimentalnog alergijskog encefalomijelitisa, kolagenom indukovano artritisa, lajmskog artritisa, IBD, i autoimunskog dijabetesa (T1D). (Larsson. i sar, 1998; Cantorna i sar, 2000; Casteel i sar, 1998). Tretman sa nisko-kalcemijskim analogom vitamina D je imao profilaktički kao i terapijski efekat na mišjem modelu Th1-kolitisa (Daniel i sar, 2006). Administracija $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ili njegovih analoga u mišijem eksperimentalnom modelu dijabetesa moduliše ekspresiju hemokina i citokina i sprečava dijabetes (Gysemans i sar, 2005).

Većina kliničkih ispitivanja sa prirodnim D hormonom ili njegovim prirodnim prekursorima, kao i VDR agonistima (među kojima i alfa-kalcidol), je fokusirana na njihovo delovanje na koštane ili mišićnoskeletne funkcije, ali je takođe pokazan terapijski potencijal kod hroničnih bolesti, kao što su kardiovaskularne i autoimunske bolesti, kancer, dijabetes, i infekcije.

2.0 RADNA HIPOTEZA

H0 -Tretman alfakalcidolom stimulise nastanak regulatornih T ćelija, smanjuje sekreciju proinflamatornih molekula kod pacijenata sa aktivnim reumatoidnim artritismom na standardnoj terapiji lekovima koji menjaju tok bolesti i u *in vitro* uslovima ima imunomodulatorno dejstvo na mononuklearne ćelije periferne krvi kako kod pacijenata tako i kod zdravih dobrovoljaca.

H1. Oralna primena 2mcg alfa-kalcidola (vitamin D sintetskog analoga) dnevno ima pozitivno kliničko terapijsko delovanje i ostvaruje imunomodulatorni efekat na regulatorne T ćelije, regulaciju citokinske mreže i oksidativni stres kod pacijenata sa aktivnim reumatoidnim artritismom na standardnoj terapiji bolest modifikujućim lekovima.

H2. Suplementacija alfakalcidolom, kalcitriolom, metilprednizolonom i istovremena suplementacije alfakalcidolom i metilprednizolonom različito utiče na stimulisanu produkciju citokina u kulturama mononuklearnih ćelija zdravih osoba i bolesnika sa aktivnim Reumatoidnim artritismom.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitivanje *ex vivo* i *in vitro* imunomodulatornih efekata alfakalcidola kod zdravih kontrola

a) Ispitati u kulturama mononuklearnih ćelija, zdravih osoba efekat *in vitro* suplementacije alfakalcidolom, kalcitriolom, metilprednizolonom i istovremene suplementacije alfakalcidolom i metilprednizolonom na stimulisanu produkciju citokina.

2. Ispitivanje *ex vivo* i *in vitro* imunomodulatornih efekata alfakalcidola kod bolesnika sa aktivnim reumatoidnim artritismom na standardnoj terapiji bolest modifikujućim lekovima.

a) Ispitati u kulturama mononuklearnih ćelija, zdravih osoba i bolesnika sa aktivnim Reumatoidnim artritismom, efekat *in vitro* suplementacije alfakalcidolom, kalcitriolom, metilprednizolonom i istovremene suplementacije alfakalcidolom i metilprednizolonom na stimulisanu produkciju citokina.

b) Kod bolesnika sa aktivnim Reumatoidnim artritismom, pre i posle dvanaestonedeljne primene 2 mcg alfakalcidola dnevno, u kulturama mononuklearnih ćelija, ispitati stimulisanu produkciju citokina, analizirati prisustvo reaktivnih kiseoničnih jedinjenja i odrediti potencijal mitohondrijalne membrane.

c) Proceniti zastupljenost regulatornih T ćelija kod bolesnika sa aktivnim Reumatoidnim artritismom, pre i posle dvanaestonedeljne primene 2 mcg alfakalcidola dnevno, i kod zdravih osoba.

3. Analiza i upoređivanje kliničkih efekata alfakalcidola.

a) Uporediti aktivnost antioksidativnih enzima, produkciju citokina, nivo 25(OH)D, C-reaktivnog proteina i sedimentacije kod bolesnika sa aktivnim Reumatoidnim artritismom, pre i posle dvanaestonedeljne primene 2 mcg alfakalcidola dnevno i zdravih osoba.

- b) Utvrditi terapijsku kliničku efikasnost dvanaestonedeljne primene 2 mcg alfakalcidola dnevno kod bolesnika sa aktivnim Reumatoidnim artritisom i uporediti sa rezultatima dobijenim u eksperimentalnim uslovima.

4. MATERIJAL I METODE

Eksperimenti koji su u sklopu doktorske disertacije urađeni su u laboratorijama Instituta za reumatologiju i Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog Fakulteta u Beogradu.

Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, prema preporukama od strane Internacionalne konferencije za harmonizaciju i standardima dobre kliničke prakse (ICH-GCP). Odobrena je od strane Etičkog komiteta Instituta za reumatologiju i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Takođe, evaluirana je i odobrena od strane Agencije za lekove i pomoćna lekovita sredstva Republike Srbije.

4.1. DIZAJN STUDIJE

U ispitivanje je uključena grupa od 20 zdravih dobrovoljaca (zaposleni na Institutu za reumatologiju kod kojih je isključeno postojanje metaboličkih, autoimunskih ili nekih drugih hroničnih oboljenja) i koja je odgovarala grupi pacijenata obolelih od RA prema polu i godinama starosti, kao i godišnjem dobu u kome su skupljani uzorci.

Takođe, u ispitivanje je uključeno 16 bolesnika sa aktivnim reumatoidnim artritismom (RA) koji su se lečili na Institutu za reumatologiju od juna 2012. do juna 2015. godine. Pacijenti su bili na standardnoj terapiji metotreksatom (MTX, stabilna doza 10-25mg/nedeljno) tokom najmanje tri meseca i sa aktivnom bolešću tokom najmanje mesec dana. Dijagnoza RA je bila postavljena prema ACR kriterijumima (Neogi i sar, 2010) najmanje šest meseci pre uključanja u istraživanje.

Aktivnost bolesti je definisana prema indeksu aktivnosti bolesti DAS28. Indeks aktivnosti bolesti DAS28 je kombinovani indeks za procenu aktivnosti RA koji obuhvata procenu bola i otoka na 28 zglobova (ramena, laktovi, ručja, MCP, PIP i kolena), vrednost SE i opšte zdravstveno stanje bolesnika procenjeno na VAS skali. Bolest je definisana kao aktivna, ukoliko je za pacijenta indeks aktivnosti bolesti DAS28 bio veći od 3,2 (DAS 28 (SE) >3,2.) tokom najmanje mesec dana uprkos terapiji lekovima koji modifikuju tok bolesti (LMB). Ukoliko su pacijenti uzimali

nesteroidne antiinflamatorne lekove (NSAIL), morali su biti na stabilnoj dozi ovih lekova najmanje četiri nedelje pre uključenja u studiju.

Glikokortikoidna terapija (sistemska ili lokalna) nije mogla biti korišćena minimum mesec dana pre uključenja u studiju.

Ukoliko je bio ispunjen bilo koji od kriterijuma za isključivanje, pacijenti su bili isključeni iz studije.

4.1.1. Kriterijumi za isključivanje: bilo kakva aktivna infekcija; prethodna istorija poremećaja metabolizma kalcijuma ili prisustvo bubrežnih kamenaca i kamenaca mokraćne bešike ili poremećaj metabolizma kalcijuma tokom studije; psihijatrijska oboljenja i/ili socijalno stanje koje može ograničiti ili onemogućiti sprovođenje ispitivanja prema utvrđenom protokolu; simptomi teške, progresivne ili nekontrolisane bolesti nekog drugog organskog sistema; nasledna metabolička bolest; prisustvo maligne bolesti ili postojanje istorije maligne bolesti u prethodnih 10 godina.

4.1.2. Informisani Pristanak

Svi pacijenti i zdravi dobrovoljci su pre uključenja u studiju potpisali obrasce informisanog pristanka. Detaljno im je objašnjena priroda studije, njen cilj i značaj, kao i sve procedure u koje su bili uključeni. Takođe, objašnjeni su im i mogući rizici tokom učestvovanja u studiji.

4.2. STUDIJSKI PROTOKOL

Bolesnicima koji su bili uključeni u studiju, nakon potpisivanja Informisanog pristanka, periferna krv je uzeta dva puta: jedanput na početku studije, i drugi put nakon tri meseca od početka tretmana alfakalcidolom. Alfakalcidol je bolesnicima administriran u vidu tvrdih želatinoznih kapsula za oralnu primenu u dozi od 2mcg dnevno (Alfa D3, kapsule 0.5mcg, Zdravlje A.D. u saradnji sa TEVA Pharmaceutical Industries) uz ostalu nepromenjenu terapiju.

Zdravim kontrolama je periferna krv uzeta jedanput, nakon potpisivanja Informisanog pristanka.

Uzorci perifirene krvi korišćeni su, nakon predhodne laboratorijske obrade za sledeća ispitivanja:

1. U kulturama mononuklearnih ćelija izolovanih iz periferne krvi zdravih i bolesnika sa aktivnim RA pre terapije alfakalcidolom ispitivan je efekat *in vitro* tretmana alfakalcidolom, kalcitriolom, metilprednizolonom i kombinacijom alfakalcidol/metilprednizolon na stimulisanu produkciju citokina. Za tretman ćelija u kulturi, alfakalcidol i kalcitriol su bili rastvarani u apsolutnom etanolu u skladu sa njihovom rastvorljivošću u ovom rastvaraču, vodeći računa da konačna koncentracija etanola u ćelijskoj kulturi ne prelazi dozvoljenu koncentraciju od 1%. S obzirom da su rastvori nestabilni, čuvani su na -80°C , dok su suve supstance čuvane na -20°C .
2. U kulturama mononuklearnih ćelija izolovanih iz periferne krvi bolesnika sa RA pre i posle dvanaestonedeljne terapije sa alfakalcidolom i zdravih kontrola merena je stimulisana produkcija citokina, analizirano prisustvo reaktivnih kiseoničnih jedinjenja i određivan potencijal mitohondrijalne membrane.
3. Aktivnost antioksidativnih enzima merena je u eritrocitima izdvojenim iz periferne krvi bolesnika sa RA pre i posle dvanaestonedeljne terapije sa alfakalcidolom i zdravih kontrola.
4. Koncentracija malondialdehida, citokina, $25(\text{OH})\text{D}_3$ i C-reaktivnog proteina određivana je iz seruma izdvojenih iz periferne krvi bolesnika sa RA pre i posle dvanaestonedeljne terapije sa alfakalcidolom i zdravih kontrola.
5. Iz uzoraka pune krvi bolesnika sa RA pre i posle dvanaestonedeljne terapije sa alfakalcidolom i zdravih kontrola određivane su regulatorne T ćelije i brzina sedimentacije eritrocita.

4.3. ĆELIJSKE KULTURE

4.3.1. Izolacija mononuklearnih ćelija (engl. periferal blood mononuclear cells, PBMC) iz periferne krvi

Za *in vitro* tretmane korišćeni su PBMC periferne krvi bolesnika i zdravih kontrola. Za izolaciju PMBC iz pune krvi korišćene su epruvete sa gradijentom gustine za izolaciju mononuklearnih ćelija BD Vacutainer, prema protokolu proizvođača. Ćelije su zatim taložene centrifugiranjem (500g, 5minuta) i resuspendovane u medijumu. Iz ćelijskih suspenzija, deo ćelija je resuspendovan u fosfatnom puferu (PBS-u) sa 0,1% tripan-plavog (BDSL, V. Britanija) i broj ćelija je određivan brojanjem pod mikroskopom u komori po Bürker-Türk-u, pri čemu mrtve ćelije (obojene u plavo usled narušene građe membrane) nisu brojane. Potom su ćelijske suspenzije podešavane do željene gustine za odgovarajući eksperiment.

4.3.2. Priprema medijuma za kultivisanje ćelija

Za pripremu ćelijskih suspenzija i kultivisanje ćelija korišćen je medijum RPMI-1640 (Sigma, SAD) u koji su dodavane sledeće supstance: 20 mM pufer HEPES (Flow Laboratories, V. Britanija), 50 μ M 2-merkaptetanol (Fluka, Nemačka), 2 mM Lglutamin (US Biochemical Corp., SAD), 10 mM natrijum-piruvat (Sigma), antibiotik- antimikotik mikstura (1%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Fetalni teleći serum (FCS, PAA laboratories, Austrija) koji je prethodno inkubiran 30 minuta na 56 °C, u cilju inaktivisanja komponenti komplekta, je dodavan medijumu u koncentraciji od 10 % za kultivisanje ćelija.

4.3.3. Kultivisanje ćelija

Ćelijska kultura humanih PBMC je kultivisana u pločama za kultivaciju sa 24 ili 96 bazenčića ravnog dna (Sarstedt, Nemačka) u odgovarajućem medijumu (RPMI 1640 puferovan HEPES-om) u inkubatoru sa vlažnom atmosferom (New Brunswick Scientific Innova CO2 inkubator), na temperaturi od 37 °C i pri koncentraciji CO2 od 5%. Vreme inkubacije i tretman ćelija je varirao u zavisnosti od eksperimenta. Ćelije u kulturi su bile stimulisane forbol 12-miristat 13-acetatom (PMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) u finalnoj koncentraciji od 10ng/ml i jonomicinom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) u finalnoj koncentraciji od 1.25 μ M. Za merenje produkcije citokina, ćelije su kultivisane u pločama za kultivaciju sa 24 bazenčića (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) (1x10⁶/1000 μ l/bazenčić) tokom 48 h. Za merenje produkcije superoksidnih

anjona i određivanje potencijala mitohondrijalne membrane ćelije su zasejavane u koncentraciji $0.5 \times 10^6 / 1000 \mu\text{l}$ /bazenčić.

4.3.4. Ispitivanje uticaja alfakalcidola i kalcitriola na vijabilitet ćelija

Citotoksičnost alfakalcidola i kalcitriola je određivana kolorimetrijskom metodom zasnovanom na merenju aktivnosti kisele fosfataze nakon 24 h tretmana mononuklearnih ćelija periferne krvi desetostruko opadajućim koncentracijama ispitivanih jedinjenja (1000 – 0.1 nM).

Test merenja aktivnosti lizozomalnog enzima kisele fosfataze je primenjen sa ciljem utvrđivanja broja živih ćelija po proceduri Yang i sar. (1996). Princip testa je da u živim ćelijama kisela fosfataza hidrolizuje *p*-nitrofenil fosfat pri čemu nastaje *p*-nitrofenol. Ukratko, po isteku tretmana (24 h, 48h i 72h) u svaki bunar (osim u bunare u prvoj koloni) je dodavano po 50 μl sveže pripremljenog supstrata za kiselu fosfatazu (10 mM *p*-nitrofenil fosfata u 0.3 M natrijum acetatu, pH 5.5, sa 0,3% Triton X-100). Nakon dvočasovne inkubacije na 37 °C, reakcija je prekidana dodavanjem 1,3 M NaOH, u količini od 50 μl /bunaru. Apsorbance su merene na talasnoj dužini od 405 nm na čitaču za mikrotitar ploče (Sunrise; Tecan, Dorset, UK) i rezultati su predstavljeni u procentima (%) apsorbanci u odnosu na netretirane (kontrolne) ćelije čiji je vijabilitet arbitarno preračunat na 100%. Na osnovu dobijenih rezultata određena je koncentracija alfakalcidola i kalcitriola i vreme inkubacije za dalje eksperimente.

4.4. TRETMAN ĆELIJA U KULTURI

Kulture mononuklearnih ćelija ispitivane su nakon različitih tretmana tj. suplementacije medijuma jednom od ispitivanih supstanci: alfakalcidol, kalcitriol, metil-prednisolon ili istovremeno alfakalcidolom i metil-prednisolonom.

Suplementacija alfakalcidolom

Odmah nakon uspostavljanja kulture PBMC, ćelije (postavljene u ploče sa 24 bazenčića, gustine 10^6 ćelija u finalnoj zapremini od 1ml) su bile tretirane rastvorom

alfakalcidola (rastvor aktivne supstance (TEVA Pharmaceuticals Ltd) u apsolutnom etanolu) u finalnoj koncentraciji od 10nM. Čelije su nakon toga inkubirane 48h.

Suplementacija kalcitriolom

Odmah nakon uspostavljanja kulture PBMC, ćelije (postavljene u ploče sa 24 bunara, gustine 10^6 celija u finalnoj zapremini od 1ml) su bile tretirane rastvorom kalcitriola (rastvor aktivne supstance (TEVA Pharmaceuticals Ltd) u apsolutnom etanolu) u finalnoj koncentraciji od 10nM. Čelije su nakon toga inkubirane 48h.

Suplementacija metilprednizolonom

Odmah nakon uspostavljanja kulture PBMC, ćelije (postavljene u ploče sa 24 bunara, gustine 10^6 celija u finalnoj zapremini od 1ml) su bile tretirane rastvorom metilprednizolona (Nirypan 40mg/ml, Hemofarm, Vršac, Srbija) u finalnoj koncentraciji od 400nM i 800nM. Čelije su nakon toga inkubirane 48h.

Istovremena suplementacija alfakalcidolom i metilprednizolonom

Odmah nakon uspostavljanja kulture PBMC, ćelije (postavljene u ploče sa 24 bunara, gustine 10^6 celija u finalnoj zapremini od 1ml) su bile tretirane rastvorom alfakalcidola u finalnoj koncentraciji 10nM i metilprednizolonom (Nirypan 40mg/ml, Hemofarm, Vršac, Srbija) u finalnoj koncentraciji od 400nM i 800nM. Čelije su nakon toga inkubirane 48h.

4.5. ANALIZA KARAKTERISTIKA ĆELIJA U KULTURI PRIMENOM PROTOČNE CITOMETRIJE (FACS ANALIZA)

Protočna citometrija je tehnologija koja omogućava istovremeno određivanje više karakteristika pojedinačnih čestica (odnosno ćelija), dok ih struja tečnosti nosi ispred zraka usmerene monohromatske svetlosti. Karakteristike čestica (ćelija) koje se mogu određivati protočnom citometrijom su relativna veličina čestice, njena unutrašnja složenost (granularnost), kao i relativni intenzitet fluorescence. Značajna prednost ove metode je što se merenja vrše pojedinačno, za svaku česticu u suspenziji (svaka pojedinačna ćelija je poseban uzorak), tako da se analizom ovako dobijenih podataka dobijaju statistički relevantni podaci koji se odnose na sveukupnu populaciju ćelija.

Za potrebe ovog istraživanja ispitivan je stepen oksidativnog stresa, prisustvo superoksidnog anjona i stepen depolarizacije mitohondrija, u kulturi stimulisanih ćelija. Ćelije su zasejavane u ploče za kultivaciju ćelija sa 24 bazenčića (500.000 ćelija u finalnoj zapremini od 1 ml), a zatim korišćene za FACS analize. Parametri oksidativnog stresa su analizirani na aparatu FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Svaka analiza je obuhvatila 10 000 događaja tj. ćelija po pojedinačnom uzorku za tretmane koji su rađeni u duplikatu ili triplikatu. Dobijeni podaci su analizirani korišćenjem kompjuterskog programa BD Cell Quest Pro

4.5.1. Analiza prisustva reaktivnih kiseoničnih jedinjenja u ćelijama protočnom citometrijom

Produkcija superoksidnih anjona u mitohondrijama tretiranih ćelija je analizirana protočnom citometrijom merenjem intenziteta crvene fluorescence (FL2) koju emituje fluorohrom dihidroetidijum, koji se specifično vezuje za superoksidni anjon (DHE; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Njime su ćelije bojene prema instrukcijama proizvođača. Ukratko, DHE je po isteku tretmana dodavan ćelijama u finalnoj koncentraciji od 20 μM . Nakon 30 min inkubacije na 37 °C i prebacivanja u odgovarajuće epruvete, ćelije su 2x centrifugirane, 500g/5min/22°C, i između toga oprane 1x1 ml PBS da bi finalno bile resuspendovane u 500 μl PBS i analizirane na protočnom citometru. Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta fluorescence, pri čemu pomeraj krive raspodele intenziteta fluorescence udesno u odnosu na krivu raspodele intenziteta fluorescence u kontrolnim (netretiranim) ćelijama, odgovara povećanju intenziteta crvene fluorescence (FL2) tj. indirektno ukazuje na povećanu produkciju superoksidnog anjona u određenom tretmanu za koga se DHE boja vezuje.

Potencijal mitohondrijalne membrane određivan je uz pomoć lipofilne katjonske boje JC1 (R&D Systems, Minneapolis, MN), koja pri hiperpolarizaciji unutrašnje membrane mitohondrija stvara agregate fluorescentne crvene boje (FL2). Međutim, pri depolarizaciji membrane mitohondrija ne dolazi do stvaranja agregata molekula boje i ona ostaje u svojoj fluorescentno zelenoj monomernoj formi (FL1). Dakle, pri analizi rezultata meren je intenzitet FL1 i FL2 fluorescenci tj. analiziran je njihov

odnos (FL1/FL2). U tom smislu, ako tretman dovodi do depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija, dolazi do porasta odnosa zelene i crvene fluorescence (FL1/FL2). Ukratko, ćelije su po isteku tretmana bojene u skladu sa instrukcijama proizvođača. Nakon centrifugiranja i pranja, talog ćelija je resuspendovan u 300 μ l 10x razblaženog pufera za DePsipher u koga je dodata boja (finalno razblaženje 1/1000). Nakon inkubacije (37°C, 30 min) ćelije su centrifugirane, oprane 1x1 ml PBS i finalno resuspendovane u 500 μ l PBS. Fluorescenca zelenih monomera ili crvenih agregata je merena protočnim citometrom i prezentovana kao odnos crvene i zelene fluorescence (FL2/FL1) koji korelira sa vrednošću potencijala mitohondrijalne membrane ($\Delta\Psi$).

4.6. ODREĐIVANJE PRODUKCIJE CITOKINA

Produkcija citokina u supernatantima ćelijskih kultura i serumima određivana je ELISA (od engl. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) metodom. U tu svrhu korišćene su ploče za mikrotitraciju (Nunc, Danska) i komercijalni kompleti monoklonskih antitela za merenje odgovarajućih citokina i to: IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-6, IL-10, IL-4, IL-21 i TGF-beta (BD Biosciences Pharmingen, SAD). Supernatanti kultura su sakupljani posle inkubacije od 48 h i odvajani od ćelija centrifugiranjem (1200g, 5 minuta). Supernatanti i serumi su zamrzavani na -80°C i čuvani do analize. Sam postupak izvođenja ELISA metode obavljan je sa reagensima i rastvorima i prema protokolima obezbeđenim od strane proizvođača. Tipičan protokol se sastojao iz sledećih faza: oblaganje ploče sa primarnim antitelom (50 μ l/bazenčić, preko noći na 4° C), ispiranje (5 x 300 μ l/bazenčić), blokiranje (200 μ l/bazenčić, 1 h na sobnoj temperaturi), ispiranje (5 x, 300 μ l/bazenčić), inkubacija uzoraka (50 μ l/bazenčić, 2 h uz mećanje na sobnoj temperaturi), ispiranje (5 x 300 μ l/bazenčić), inkubacija sa sekundarnim antitelom obeleženim biotinom (50 μ l/bazenčić, 1 h na sobnoj temperaturi), ispiranje (5 x 300 μ l/bazenčić), inkubacija sa avidin-enzimskim kompleksom (peroksidaza) (50 μ l/bazenčić, 30 minuta na sobnoj temperaturi), ispiranje (7 x 300 μ l/bazenčić), inkubacija sa supstratom (tetrametilbenzidin, TMB) (50 μ l/bazenčić, do 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku), zaustavljanje reakcije sa 50 μ l 1M HCl ili H₂SO₄ i očitavanje apsorbancije

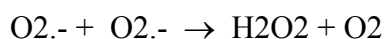
pomoću spektrofotometra (RT-2100C Microplate Reader) korišćenjem filtra za 450 nm. Svaki uzorak je rađen u duplikatu, a za pojedine citokine (IFN- γ , TNF- α , IL-6 i IL-10), supernatanti su razblaživani pre analize (4, 10 ili 50 puta). Količina citokina (u pg/ml) određivana je korišćenjem standardne krive dobijene na osnovu vrednosti apsorbancije standarda - rekombinantnog citokina definisane koncentracije koji je prethodno serijski razblažen (dvostruko opadajuća razblaženja u rasponu od 10000 pg/ml do 15,6 pg/ml).

4.7. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA

Aktivnost antioksidativnih enzima (SOD, CAT i GPx kao i nivo GSH) određivana je u lizatu eritrocita spektrofotometrijskom metodom, a nivo hemoglobina na hematološkom analizatoru (Beckman Coulter AcT diff). Koncentracija malondialdehida (MDA) u serumu određivana je takođe spektrofotometrijski. Vrednosti ispitivanih parametara izražavane su kao mmol/g Hb za GSH, U/g Hb za SOD, CAT i GPx, i nmol/ml za MDA.

Superoksid-dismutaza (SOD)

Superoksid dizmutaza je enzim koji katališe reakciju:



Određivana je metodom koja se zasniva na njenoj sposobnosti da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina, odnosno da inhibira stvaranje adrenohroma u toku spontane oksidacije adrenalina u baznoj sredini, na pH 10.2. Aktivnost ukupne SOD određena je kinetički, praćenjem brzine stvaranja adrenohroma uz pomoć spektrofotometra, kao promena ekstinkcije u vremenu (10 min) na talasnoj dužini od 480nm (Sun and Zigman, 1978).

Katalaza (CAT)

Katalaza (E.C 1.11.1.6) razlaže vodonik peroksid na vodu i molekul kiseonika. Nerazloženi vodonik peroksid (supstrat) sa amonijum molibdatom, gradi žuto

obojeno, kompleksno jedinjenje, čiji se intenzitet određuje spektrofotometrijski pri $\lambda=405$ nm (L. Goth, 1991).

Redukovani Glutation (GSH)

Sadržaj redukovanog glutaciona (GSH), određivan je Ellman-ovom metodom, koja se zasniva na reakciji 5,5'-ditiobis-2,2'-nitrobenzojeve kiseline (DTNB) tzv. Ellman-ovog reagensa sa alifatičnim tiolnim jedinjenjima u baznoj sredini pH 8.0, pri čemu se stvara jedan mol p-nitrofenol anjona po molu tiola. Obzirom da je ovaj anjon u baznoj sredini jako žuto prebojen, intenzitet boje se koristi za merenje koncentracije GSH, očitavanjem ekstinkcije na spektrofotometru pri 412nm (Ellman, 1959).

Glutation peroksidaza (GPx)

Aktivnost glutacion peroksidaze (GPx) se određuje na osnovu procenja oksidacije redukovanog GSH od strane GPx koristeći NADPH, reakcijom u koju katalizuje enzim glutacion reduktaza. Smanjenje apsorbancije na 340 nm je rezultat iskoriscenog NADPH i predstavlja meru GPx aktivnosti u reakciji koju katalizuje enzim glutacion reduktaza (Gunzler i sar., 1974).

Malondialdehid (MDA)

Lipidna peroksidacija, koja se izražava kao koncentracija malondialdehida (MDA), je određivana spektrofotometrijski u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom. Tiobarbiturna kiselina reaguje sa MDA poreklom iz polinezasićenih masnih kiselina koje ulaze u sastav fosfolipida plazma membrane oštećenih dejstvom ROS-a, formirajući žuti kompleks čija apsorbancija je merena na 533nm (trihlorsirćetna kiselina, Sigma; 2-tiobarbiturna kiselina, Sigma) (S. Rehnecrona, 1980).

4.8. ODREĐIVANJE REGULATORNIH T ĆELIJA

U cilju određivanja ukupnih i aktiviranih regulatornih T limfocita vršena je fenotipska karakterizacija limfocita iz periferne krvi bolesnika pre i posle terapije alfa-kalcidolom

i zdravih tehnikom direktne i indirektno imunofluorescencije korišćenjem protočnog citofluorimetra BD FACS Aria III™ (Beckton Dickinson, San Jose, SAD).

U cilju određivanja čiste populacije regulatornih T-ćelija detektovana ekspresija sledećih površinskih markera: CD3 (marker T limfocita), CD4 (marker Th ćelija), CD25 (marker T regulatornih ćelija), CCR4 (marker cirkulišućih memorijskih CD4+ limfocita), CD127 (površinski ćelijski marker makrofagno/monocitne loze za identifikaciju CD4+FoxP3 T ćelija), CD45 (univerzalni marker leukocita), CD45RO (marker memorijskih T ćelija), HLA-DR (marker aktiviranih T reg ćelija).

Korišćena monoklonska i poliklonska antitela i njihove koncentracije/razblaženja navedeni su u Tabeli 1. Po uzimanju periferne krvi od pacijenata, zapremina od 100µl pune krvi je prebacivana u plastične epruvete. Zatim su dodavana odgovarajuća antitela u 100 µl PBS-a sa 2 % FCS-a i ćelije su inkubirane 30 do 45 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacionog perioda ćelije su lizirane primenom rastvora FACS Lysing Buffer (BD Biosciences) i nakon energičnog mešanja inkubirane u mraku na sobnoj temperaturi dodatnih 10 minuta. Centrifugirane su 5 min na 400g a zatim oprane dva puta u 2ml PBS-a. Potom su resuspendovane u 500 µl PBS-a i analizirane na protočnom citofluorimetru.

Tabela 1. Antitela korišćena za fenotipsku karakterizaciju ćelija

Antitelo	Proizvođač	Razblaženje	Obeleživac
CD4	BD Biosciences	1:120	PerCp-Cy5.5
CD25	BD Biosciences	1:30	PE
CCR 4	BD Biosciences	1:60	PE-Cy7
CD127	BD Biosciences	1:10	APC
CD45	BioLegend	1:300	AF700
CD45RO	BD	1:60	APC-H7

	Biosciences		
CD3	BD Biosciences	1:60	V450
HLA-DR	BD Biosciences	1:60	V500

* od engl. Streptavidin/Peridinin Chlorophyll protein (Sav/PerCP) Conjugate

Antitela koja su konjugovana sa biotinom su kasnije obeležena sa SA_v-FITC

FITC – (fluorescein isothiocyanate) fluorescein izotiocijanat,

PE – (R-phycoerythrin) fikoeritrin

PE-Cy7 – (R-phycoerythrin) fikoeritrin cijanin 7

APC – (allophycocyanin) alofikocijanin

AF700 – Alexa Fluor 700

APC-H7 - (allophycocyanin-H7) alofikocijanin

V450 – (violet-excitable dye 450) violet 450nm

V500 - (violet-excitable dye 500) violet 500nm

4.9. MERENJE NIVOVA VITAMINA D

Serumi pacijenata su sakupljeni na prvoj viziti i nakon 12 nedelja studijskog protokola i odvajani od ćelija centrifugiranjem (300g, 15 minuta). Potom su zamrzavani i čuvani na -80°C do analize. Koncentracija 25(OH)D₃ određivana je metodom elektrohemiluminiscencije na automatskom analizatoru (Elecsys 2010 Roche).

4.10. ODREĐIVANJE PARAMETARA AKTIVNOSTI BOLESTI

Pre i posle terapije alfa-kalcidolom bolesnicima je merena koncentracija C-reaktivnog proteina u serumu imunoturbidimetrijskim metodom na biohemijskom analizatoru (ILAB 300 plus) i određivan DAS28 indeks koji uključuje brzinu sedimentacije rađenu po Westergreen metodi.

4.11. STATISTIČKA ANALIZA

U obradi podataka korišćene su metode deskriptivne i analitičke statistike. U cilju deskripcije podataka, kvantitativna obeležja posmatranja predstavljena su merama centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana) i merama varijabiliteta (standardna devijacija, interkvartilni opseg), dok su kvalitativna obeležja posmatranja predstavljena apsolutnim i relativnim brojevima (procentima). Normalnost raspodele kvantitativnih numeričkih obeležja testirana je pomoću Kolmogorov-Smirnov testa. Logaritamska transformacija korišćena je u svrhu normalizacije kontinuiranih varijabli koje nisu pokazale normalnu raspodelu. Studentov T-test je bio korišćen za testiranje statističke značajnosti razlika između grupa po kontinuiranim varijablama koje se ponašaju po tipu normalne raspodele, dok su obeležja koja odstupaju od normalne raspodele analizirana pomoću Mann Whitney-U testa. Za testiranje statističke značajnosti razlika u učestalosti atributivnih obeležja posmatranja korišćeni su Pirsonov χ^2 – test i Fišerov (exact) test.

Razlike u produkciji citokina u grupi kontrola i/ili pacijenata pre i nakon 12 nedelja tretmana poređene su pomoću t testa za zavisne uzorke ili Wilcoxon signed-rank testa. Razlike u stimulisanim nivoima citokina između pacijenata i kontrola nakon određenog tretmana vršene su pomoću ANCOVA testa kontrolišući razlike u bazalnim vrednostima. Razlike u koncentraciji serumskog 25(OH)D, serumski parametri zapaljenja (SE i CRP), razlike u indeksu aktivnosti bolesti (DAS 28), razlike u aktivnosti antioksidativnih enzima, nivoa glutaciona i plazma koncentracija MDA i razlika u procentu aktiviranih regulatornih T celija poređene su pomoću t testa za zavisne uzorke ili Wilcoxon signed-rank testa

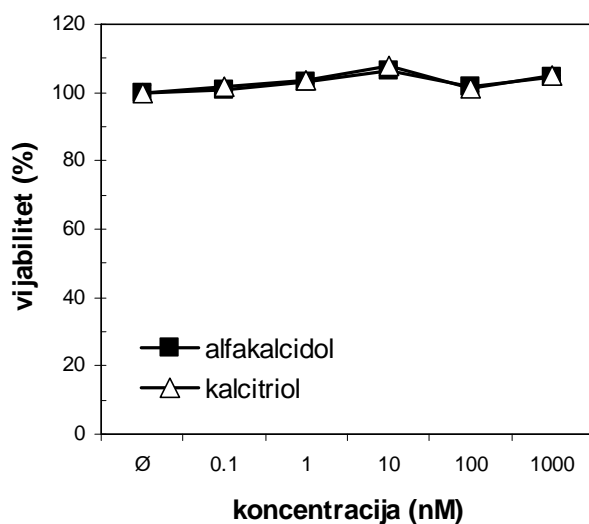
Statistička obrada podataka vršena je pomoću SPSS-20.0 programskog statističkog paketa (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Korišćen je nivo statističke značajnosti $p < 0,05$ i $p < 0.01$.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD) za podatke sa normalnom Gausovom raspodelom, ili za podatke koji nisu imali normalnu raspodelu kao Median (IQR, interquartile range). Vrednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom.

5. REZULTATI

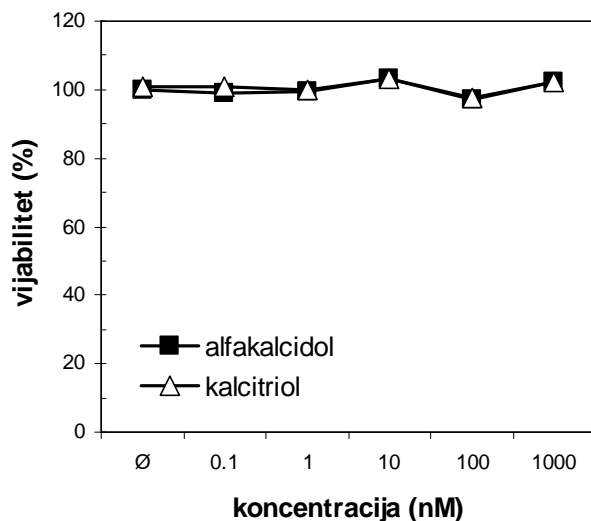
5.1. UTICAJ ALFAKALCIDOLA I KALCITRIOLA NA VIJABILITET MONONUKLEARNIH ĆELIJA PERIFERNE KRVI U KULTURI

Rezultati testa određivanja aktivnosti lizosomalnog enzima kisele fosfataze primenjenog sa ciljem utvrđivanja broja živih mononuklearnih ćelija periferne krvi (MČPK) nakon dvadestečetvoročasovnog tretmana ispitivanim jedinjenjima prikazani su na slici 1.



Slika 1. Vijabilitet humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi nakon tretmana alfacalcidolom i kalcitriolom tokom 24h. Ćelije su inkubirane sa desetostruko opadajućim koncentracijama ispitivanih jedinjenja u toku 24 h, a broj živih ćelija je određen testom aktivnosti kisele fosfataze. Rezultati iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija, a svaki tretman je rađen najmanje u triplikatu.

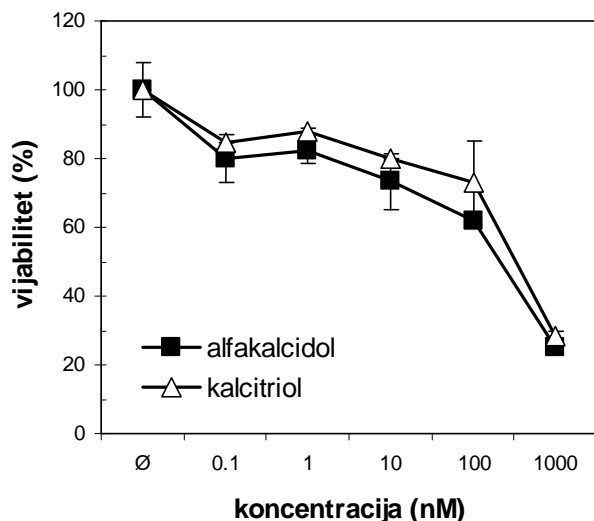
Četrdesetosmočasovni tretman humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi ispitivanim jedinjenjima je rezultovao aktivnošću lizosomalne kisele fosfataze koja je prikazana na slici 2.



Slika 2. Vijabilitet humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi nakon tretmana alfacalcidolom i kalcitriolom tokom 48h. Ćelije su inkubirane sa desetstruko opadajućim koncentracijama ispitivanih jedinjenja u toku 48 h, a broj živih ćelija je određen testom aktivnosti kisele fosfataze. Rezultati iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija, a svaki tretman je rađen najmanje u triplikatu.

Rezultati testa aktivnosti kisele fosfataze, prikazani na slikama 1 i 2, ukazuju da je u svim ispitivanim koncentracijama alfacalcidola i kalcitriola, vijabilitet mononuklearnih ćelija periferne krvi nakon 24h i 48h bio nepromenjen.

Rezultati testa aktivnosti kisele fosfataze na humanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi nakon sedamdesetdvočasovne ekspozicije delovanju alfacalcidola i kalcitriola, prikazani su na slici 3.



Slika 3. Vijabilitet humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi nakon tretmana alfakalcidolom i kalcitriolom tokom 72h. Ćelije su inkubirane sa desetostruko opadajućim koncentracijama ispitivanih jedinjenja u toku 72 h, a broj živih ćelija je određen testom aktivnosti kisele fosfataze. Rezultati iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija, a svaki tretman je rađen najmanje u triplikatu.

Nakon tretmana u trajanju od 72h došlo je do značajnog smanjenja vijabiliteta mononuklearnih ćelija periferne krvi sa oba tretmana i to pri korišćenju većih koncentracija alfakalcidola i kalcitriola. Sa tretmanom od 10nM alfakalcidola vijabilitet mononuklearnih ćelija periferne krvi iznosio je $73,3 \pm 8,1\%$, tretman od 100nM smanjivao je vijabilitet na $61,8 \pm 1,2\%$ a tretman u koncentraciji od 1000nM bio je najtoksičniji, tj. doveo je do najvećeg smanjenja broja živih ćelija na $25,0 \pm 0,6\%$.

Sa tretmanom od 10nM kalcitriola vijabilitet je iznosio $80,0 \pm 0,2\%$, tretman od 100nM smanjivao je vijabilitet na $73,0 \pm 12,1\%$ a tretman u koncentraciji od 1000nM imao je vijabilitet mononuklearnih ćelija periferne krvi od $28,4 \pm 1,2\%$.

U skladu sa tim, za sve naredne eksperimente, izabrana je kultura mononuklearnih ćelija periferne krvi od 48h u kojoj pri finalnoj koncentraciji alfakalcidola i kalcitriola od 10nM nije dolazilo do promene vijabiliteta ćelija.

5.2. EFEKAT RAZLIČITIH *IN VITRO* TRETMANA NA PRODUKCIJU CITOKINA U STIMULISANOJ KULTURI MONONUKLEARNIH CELIJA PERIFERNE KRVI ZDRAVIH OSOBA

5.2.1. Koncentracija citokina u stimuliranoj kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih kontrola pod dejstvom različite suplementacije

Mononuklearne ćelije periferne krvi zdravih kontrola su kultivisane 48h u kulturi, stimulirane PMA i jonomicinom i suplementirane jednom od ispitivanih supstanci predviđenih studijskim protokolom: alfa-kalcidol finalne koncentracije 10nM ili kalcitriol finalne koncentracije 10nM ili metilprednizolon finalne koncentracije 400nM ili 10nM alfa-kalcidola i 400nM metilprednizolona zajedno. Vrednosti koncentracija ispitivanih interleukina određene ELISA metodom prikazane su u tabelama 1 do 4.

Tabela 1. Produkcija citokina u kulturi MČPK zdravih kontrola tretiranoj sa 10nM rastvorom alfa-kalcidola

Citokin	n	Srednja vrednost (pg/ml) ± SD	Medijana (IQR)	Min-Max
IL 4	20	475,3 ± 458,2	297,7 (661,2)	7,0-1684,4
IL 17	20	309,0 ± 196,4	350 (339,3)	4,7-597,5
IL 21	20	1891,3 ± 2302,0	1366,5 (1798,5)	22,6-10484,4
TNF α	20	4190,2 ± 1396,2	4202,5 (2049,5)	1479,6-6679,9
IFN γ	20	665,5 ± 122,4	669,6 (241,4)	1566,0-2808,0

SD, Standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

Tabela 2. Produkcija citokina u kulturi MČPK zdravih kontrola tretiranoj sa 10nM rastvorom kalcitriola

Citokin	n	Srednja vrednost (pg/ml) ± SD	Medijana (IQR)	Min-Max
IL 4	20	611,0 ± 437,2	661,5 (658,3)	45,2-1407,0
IL 17	20	295,1 ± 201,4	285,6 (361,4)	0,1-615,5
IL 21	20	4966,4 ± 2650,6	1011,4 (1531,9)	57,2-8548,2
TNF α	20	4182,5 ± 1201,8	4310,6 (1750,7)	1543,9-6238,8
IFN γ	20	654,6 ± 92,7	655,7 (139,6)	506,5-799,5

SD, Standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

Tabela 3. Produkcija citokina u kulturi MČPK zdravih kontrola tretiranoj sa 400nM rastvorom metilprednizolona

Citokin	n	Srednja vrednost (pg/ml) ± SD	Medijana (IQR)	Min-Max
IL 4	20	207,9 ± 270,3	139,5 (158,1)	6,2-1136,4
IL 17	20	2031,8 ± 963,5	2159,5 (1619,3)	310,0-3276,0
IL 21	20	8315,0 ± 4662,9	8771,2 (10056,2)	1736,0-15979,6
IFN γ	20	1820,8 ± 539,5	1775,0 (788,3)	747,0-2726,0

SD, Standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

Tabela 4. Produkcija citokina u kulturi MČPK zdravih kontrola tretiranoj sa 10nM rastvorom alfakalcidola i 400nM rastvorom metilprednizolona zajedno

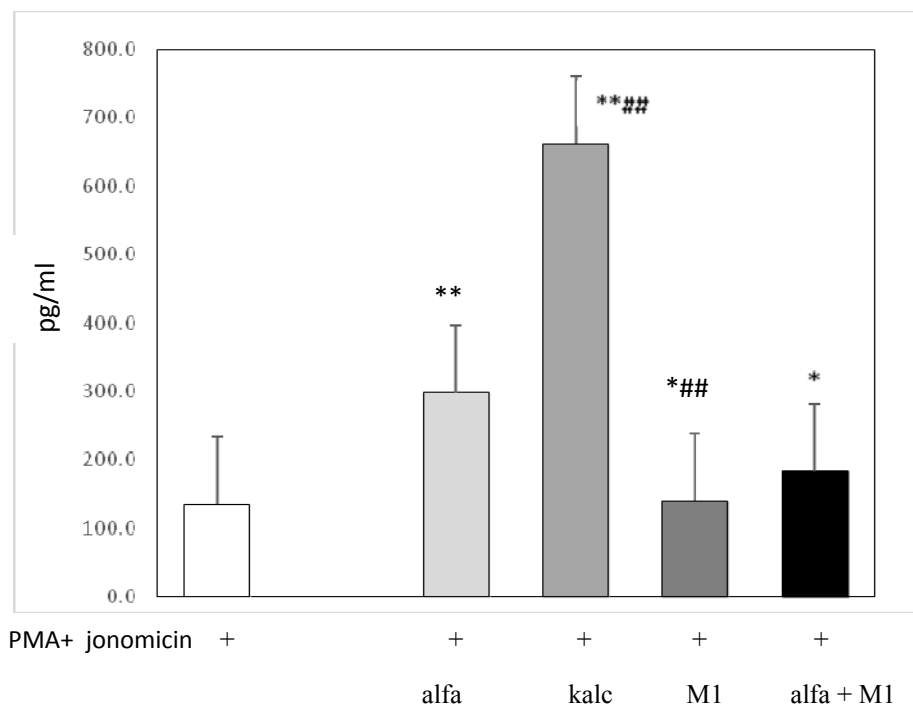
Citokin	n	Srednja vrednost (pg/ml) ± SD	Medijana (IQR)	Min-Max
IL 4	20	398,1 ± 372,1	183,4 (666,8)	2,6-1106,4
IL 17	20	1575,7 ± 979,4	1532,0 (1731,0)	158,0-3111,0
IL 21	20	1741,3 ± 1465,0	1742,6 (2187,0)	39,4-6109,8
IFN γ	20	2200,6 ± 334,6	2159,0 (514,0)	1588,0-2827,0

SD, Standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

5.2.2. Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IL-4 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih kontrola.

In vitro suplementacija kultivacionog medijuma sa različitim tretmanima, dovela je do statistički značajne promene stimulisane produkcije IL-4 u kontrolnoj grupi zdravih. U kulturi mononuklearnih ćelija bez suplementacije (kontrolni tretman) produkcija IL-4 iznosila je 134.6 (142,5) pg/ml. U kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi koja je suplementisana alfakalcidolom došlo je do visoko statistički značajnog povećanja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (134.6 vs 297.7, $p < 0.0001$). Produkcija IL-4 u ćelijama tretiranim kalcitriolom došlo je, takođe, do visoko statistički značajnog povećanja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (134.6 vs 661.5, $p < 0.0001$) ali i u odnosu i na tretman alfakalcidolom (297.7 vs 661.5, $p < 0.0001$). Nakon tretmana metilprednizolonom, došlo je do statistički značajnog povećanja produkcije IL-4 u odnosu na kontrolni tretman ($p = 0.015$) dok je produkcija bila visoko statistički značajno niza u odnosu na tretman alfakalcidolom.

Takodje, istovremeni tretman alfa-kalcidolom i metilprednizolonom, doveo je do visoko statistički značajnog porasta produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (134.6 vs 183.4, $p=0.002$), kao i do povećanja produkcije IL-4 u odnosu na tretman samo metilprednizolonom.

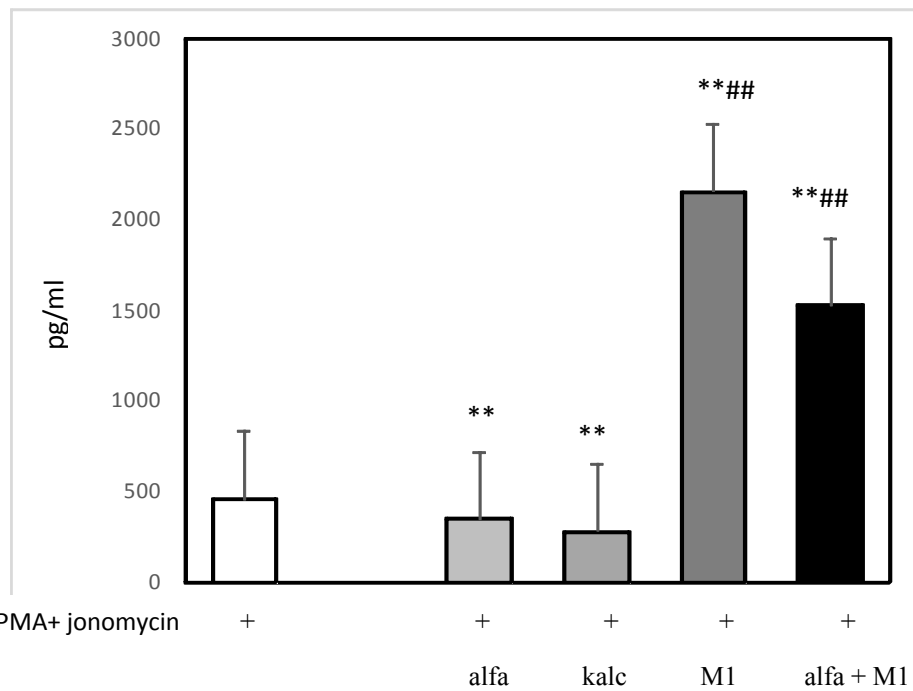


Grafik 4. Produkcija IL-4 u suplementiranim mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravih kontrola u kulturi u odnosu na bazalnu stimulisanu produkciju.

PMA+jonomicin – stimulacija; alfa – tretman rastvorom alfa-kalcidola finalne koncentracije 10nM, calc – tretman rastvorom kalcitriola finalne koncentracije 10nM; M1 - tretman rastvorom metilprednizolona finalne koncentracije 400nM; alfa+M1 - tretman rastvorom alfa-kalcidola (10nM) i metilprednizolona (400nM) zajedno. Vrednosti su predstavljene kao Median (IQR); * $p<0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju; ** $p<0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju; # $p<0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfa-kalcidol (10nM) ; ## $p<0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfa-kalcidol (10nM).

5.2.3. Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IL-17 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih kontrola.

In vitro suplementacija kultivacionog medijuma sa različitim tretmanima dovela je do statistički značajne promene stimulisane produkcije IL-17 u kulturama mononuklearnih ćelija zdravih osoba. Produkcija IL-17 u kulturi mononuklearnih ćelija bez suplementacije (kontrolni tretman) produkcija IL-17() iznosila je 462,0 (304.7) pg/ml. U kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi grupe koja je suplementisana alfakalcidolom došlo je do visoko statistički značajnog smanjenja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (462 vs 350, $p < 0.0001$). Sličan efekat na produkciju IL-17 primećen je u ćelijama suplementisanim kalcitriolom gde je došlo do, takodje, visoko statistički značajnog smanjenja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (462 vs 285.6, $p < 0.0001$) dok u odnosu na tretman alfakalcidolom nije bilo značajne razlike. Nakon tretmana metilprednizolonom, došlo je do statistički značajnog povećanja produkcije IL-17 u odnosu na kontrolni tretman (462 vs 2159.5, $p < 0.0001$) dok je rezultat bio statistički značajno viši u odnosu na efekte tretmana alfakalcidolom (350 vs 2159.5; $p < 0.01$). Takodje, istovremeni tretman alfakalcidolom i metilprednizolonom, doveo je do nešto niže produkcije IL-17 u odnosu na suplementaciju samim metilprednizolonom, dok je zabeležen statistički značajan porast produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (462 vs 1532, $p < 0.0001$). Suplementacija metilprednizolonom i zajedno metilprednizolonom i alfakalcidolom, dovela je do statistički značajno veće produkcije IL-17 u odnosu na tretman alfakalcidolom ($p < 0.0001$).



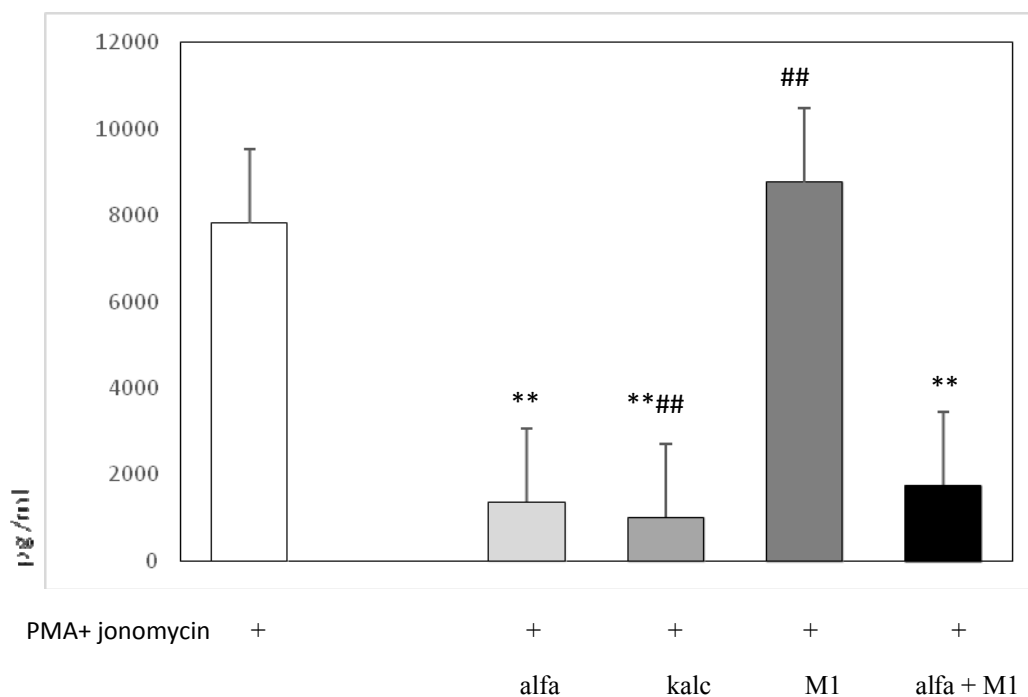
Grafik 5. Produkcija IL-17 u suplementiranim mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravih kontrola u kulturi u odnosu na bazalnu stimulisanu produkciju.

PMA+jonomicin – stimulacija; alfa – tretman rastvorom alfakalcidola finalne koncentracije 10nM, calc – tretman rastvorom kalcitriola finalne koncentracije 10nM; M1 - tretman rastvorom metilprednizolona finalne koncentracije 400nM; alfa+M1 - tretman rastvorom alfakalcidola (10nM) i metilprednizolona (400nM) zajedno. Vrednosti su predstavljene kao Median (IQR); * $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju; ** $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju; # $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM) ; ## $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM)

5.2.4. Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IL-21 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih kontrola.

In vitro suplementacija kultivacionog medijuma sa različitim tretmanima dovela je do statistički značajne promene stimulisane produkcije IL-21 u kulturama mononuklearnih ćelija zdravih osoba. Produkcija IL-21 u kulturi mononuklearnih ćelija bez suplementacije (kontrolni tretman) iznosila je 7817.8 (6603.5) pg/ml. U kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi grupe koja je suplementirana alfakalcidolom došlo je do visoko statistički značajnog smanjenja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (7817.8 vs 1366.5, $p < 0.0001$). Sličan efekat na produkciju IL-21 primećen je u ćelijama suplementiranim kalcitriolom gde je došlo

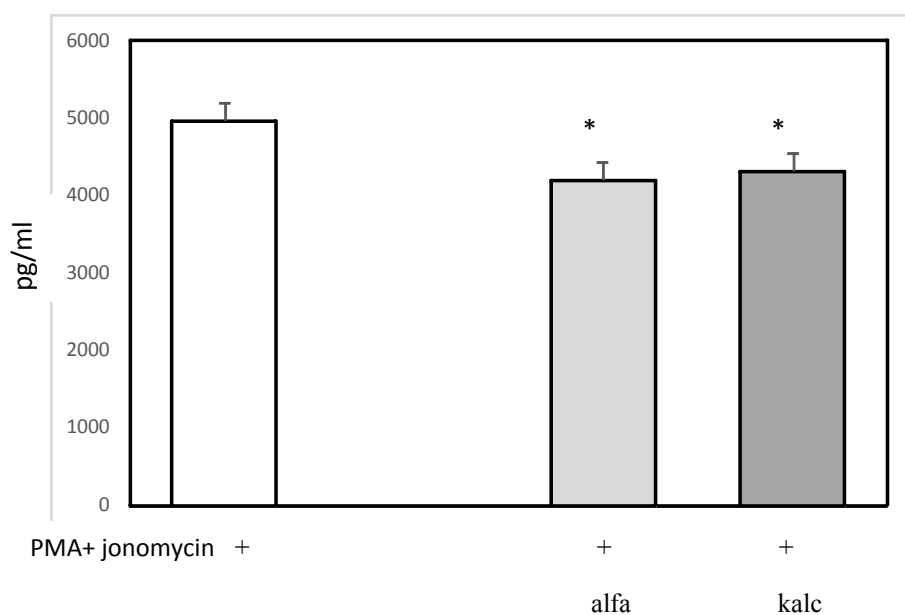
do, takodje, visoko statistički značajnog smanjenja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (7817.8 vs 1011.4, $p < 0.0001$) dok je u odnosu na tretman alfakalcidolom takodje postojala statistička značajnost ($p < 0.01$). Nakon tretmana metilprednizolonom, došlo je do blagog povećanja produkcije IL-21 u odnosu na kontrolni tretman (7817.8 vs 8771.2, $p > 0.05$) dok je rezultat u odnosu na efekte u tretmanu alfakalcidolom bio statistički značajno veći (1366.5 vs 8771.2). Istovremena suplementacija alfakalcidolom i metilprednizolonom, dovela je do značajno niže produkcije IL-21 u odnosu na tretman samim metilprednizolonom, dok je zabeležen statistički značajan pad produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (7817.8 vs 1742.1, $p < 0.0001$), tako da je produkcija IL-21 bila slična sa tretmanom alfakalcidolom ($p > 0.05$).



Grafik 6. Produkcija IL-21 u suplementiranim mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravih kontrola u kulturi u odnosu na bazalnu stimulisanu produkciju. PMA+jonomycin – stimulacija; alfa – tretman rastvorom alfakalcidola finalne koncentracije 10nM, calc – tretman rastvorom kalcetriola finalne koncentracije 10nM; M1 - tretman rastvorom metilprednizolona finalne koncentracije 400nM; alfa+M1 - tretman rastvorom alfakalcidola (10nM) i metilprednizolona (400nM) zajedno. Vrednosti su predstavljene kao Median (IQR); * $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju; ** $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju; # $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM) ; ## $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM)

5.2.5. Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju TNF- α u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih kontrola.

In vitro suplementacija kultivacionog medijuma sa različitim tretmanima dovela je do statistički značajne promene stimulisane produkcije TNF- α u kulturama mononuklearnih ćelija zdravih osoba. Produkcija TNF- α u kulturi mononuklearnih ćelija bez suplementacije (kontrolni tretman) iznosila je 4966.4 (2650.6) pg/ml. U kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi koja je bila suplementirana alfakalcidolom došlo je do statistički značajnog smanjenja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (4966.4 vs 4202.5, $p < 0.05$). Sličan efekat na produkciju TNF- α primećen je u ćelijama suplementiranim kalcitriolom gde je došlo do, takodje, statistički značajnog smanjenja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (4966.4 vs 4310.6, $p < 0.05$). Nije bilo statistički značajne razlike u nivou produkcije TNF- α izmedju ova dva tretmana.

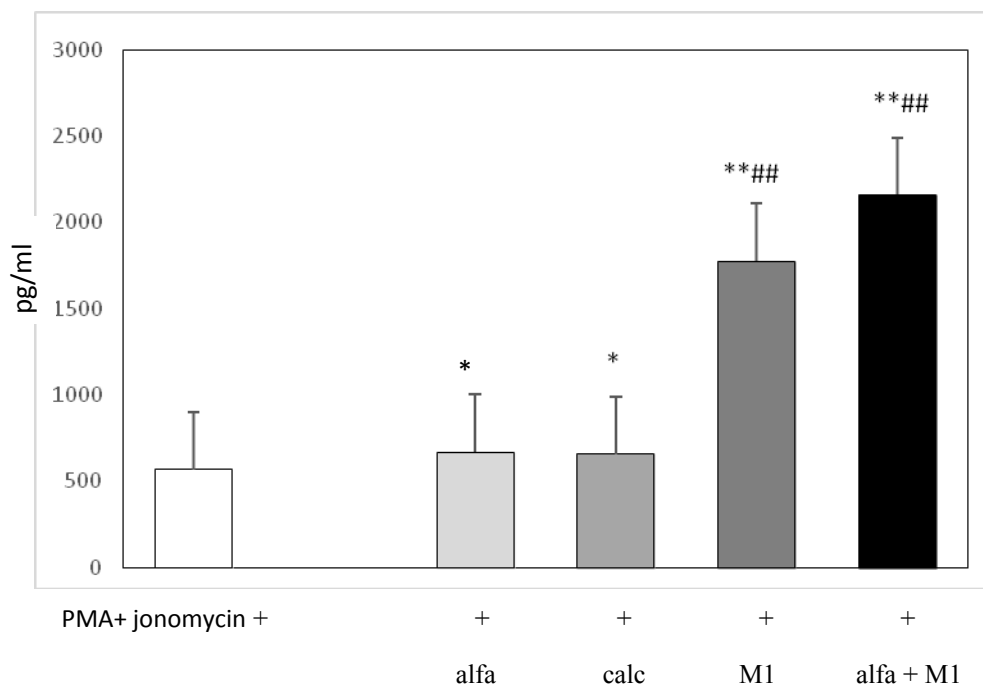


Grafik 7. Produkcija TNF- α u suplementiranim mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravih kontrola u kulturi u odnosu na bazalnu stimulisanu produkciju.

PMA+ionomicin – stimulacija; alfa – tretman rastvorom alfakalcidola finalne koncentracije 10nM; kalc – tretman rastvorom kalcitriola finalne koncentracije 10nM; Vrednosti su predstavljene kao Median (IQR); * $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju; ** $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju; # $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM) ; ## $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM)

5.2.6. Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IFN- γ u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih kontrola.

In vitro suplementacija kultivacionog medijuma sa različitim tretmanima dovela je do statistički značajne promene stimulisane produkcije IFN- γ u kulturama mononuklearnih ćelija zdravih osoba. Produkcija IFN- γ u kulturi mononuklearnih ćelija bez suplementacije (kontrolni tretman) iznosila je 568.4 (299.4) pg/ml. U kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi koja je bila suplementisana alfa-kalcidolom došlo je do statistički značajnog povećanja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (568.4 vs 669.6, $p=0.019$). Sličan efekat na produkciju IFN- γ primećen je u ćelijama suplementiranim kalcitriolom gde je došlo do, takodje, statistički značajnog povećanja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (568.4 vs 655.7, $p<0.05$) dok u odnosu na tretman alfa-kalcidolom nije bilo značajne razlike. Nakon suplementacije metilprednizolonom, došlo je do visoko statistički značajnog povećanja produkcije IFN- γ u odnosu na kontrolni tretman (568.4 vs 1775, $p<0.0001$), kao i u odnosu na tretman alfa-kalcidolom (1775 vs 669.6, $p<0.01$). Takodje, istovremena suplementacija alfa-kalcidolom i metilprednizolonom potencirala je ovaj efekat, u smislu povećanja produkcije IFN- γ u odnosu na suplementaciju samim metilprednizolonom, dok je produkcija ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman bila statistički značajno viša (2159 vs 669.6, $p<0.01$). I u odnosu na tretman alfa-kalcidolom produkcija je bila na statistički značajno višem nivou ($p<0.01$).



Grafik 8. Produkcija IFN- γ u suplementiranim mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravih kontrola u kulturi u odnosu na bazalnu stimulisanu produkciju.

PMA+jonomycin – stimulacija; alfa – tretman rastvorom alfakalcidola finalne koncentracije 10nM, calc – tretman rastvorom kalcitriola finalne koncentracije 10nM; M1 - tretman rastvorom metilprednizolona finalne koncentracije 400nM; alfa+M1 - tretman rastvorom alfakalcidola (10nM) i metilprednizolona (400nM) zajedno. Vrednosti su predstavljene kao Median (IQR); * p<0.05 u odnosu na stimulisanu produkciju; ** p<0.01 u odnosu na stimulisanu produkciju; # p<0.05 u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM) ; ### p<0.01 u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM)

5.3. EFEKAT RAZLIČITE *IN VITRO* SUPLEMENTACIJE NA PRODUKCIJU CITOKINA U STIMULISANOJ KULTURI MONONUKLEARNIH ĆELIJA PERIFERNE KRVI BOLESNIKA SA AKTIVNIM RA

5.3.1. Koncentracija citokina u stimulisanjoj kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA

Mononuklearne celije periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA su kultivisane 48h u kulturi (stimulisanoj sa PMA i jonomycinom) i suplementirane rastvorima: alfakalcidola finalne koncentracije 10nM ili kalcitriola finalne koncentracije 10nM, ili metilprednizolona finalne koncentracije 400nM ili metilprednizolona finalne koncentracije 800nM, ili istovremeno 10nM alfakalcidola i 400nM metilprednizolona

ili istovremeno 10nM al fakalcidola i 800nM metilprednizolona. Izmerene vrednosti koncentracija ispitivanih interleukina prikazane su u tabelama 5-10.

Tabela 5. Produkcija citokina u kulturi MČPK bolesnika sa aktivnim RA tretiranoj sa 10nM rastvorom **alfakalcidola**

Citokin	n	Srednja vrednost (pg/ml) ± SD	Medijana (IQR)	Min-Max
IL 4	16	99,2 ± 118,6	32,6 (158,5)	3,3-366,3
IL 6	16	2078,0 ± 3003,0	445,0 (3529,8)	102,4-11530,2
IL 10	16	416,8 ± 490,7	174,9 (757,4)	7,6-1401,8
IL 17	16	39,4 ± 60,4	15,1 (53,1)	1,4-232,1
IL 21	16	60,5 ± 91,6	26,3 (22,7)	15,0-359,2
TNF α	16	2572,1 ± 4818,5	453,6 (3405,3)	37,8-16747,6
IFN γ	16	15622,2 ± 19931,4	7940,0 (18644,7)	500,7-60972,5
TGF β	16	1769,7 ± 883,3	1729,9 (824,4)	190,4-3756,6

SD, Standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

Tabela 6. Produkcija citokina u kulturi MČPK bolesnika sa aktivnim RA tretiranoj sa 10nM rastvorom **kalcitriola**

Citokin	n	Srednja vrednost (pg/ml) ± SD	Medijana (IQR)	Min-Max
IL 4	16	105,3 ± 115,0	46,8 (150,4)	2,5-355,1
IL 6	16	2048,7 ± 2953,8	408,3 (3592,6)	86,0-11272,6
IL 10	16	422,12 ± 517,9	221,7 (800,1)	5,6-1493,6
IL 17	16	29,0 ± 48,8	10,7 (31,8)	0,4-196,7
IL 21	16	36,2 ± 48,0	19,7 (14,7)	10,2-198,9
TNF α	16	1887,8 ± 3699,8	374,5 (2300,5)	21,4-14208,5
TGF β	16	1341,9 ± 1043,7	1087,4 (923,8)	211,0-4421,0
IFN γ	16	12103,0 ± 16394,8	6701,3 (16429,2)	421,6-58503,7

SD, Standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

Tabela 7. Produkcija citokina u kulturi MČPK bolesnika sa aktivnim RA suplementiranoj sa 400nM rastvorom metilprednizolona

Citokin	n	Srednja vrednost ± SD	Medijana (IQR)	Min-Max
IL 4	16	25,9 ± 28,3	14,0 (20,1)	1,6-104,5
IL 6	16	1272,1 ± 2057,5	351,8 (1452,9)	112,9-8501,9
IL 10	16	324,5 ± 390,6	180,6 (553,4)	2,41232,2
IL 17	16	55,0 ± 76,2	19,7 (64,9)	1,7-225,7
IL 21	16	703,6 ± 787,7	443,3 (1165,2)	12,8-2821,7
TNF α	16	249,7 ± 263,9	224,9 (300,8)	12,8-984,0
TGF β	16	1193,0 ± 871,8	918,4 (1624,9)	211,0-2776,2
IFN γ	16	15463,5 ± 17452,6	9144,4 (14895,3)	603,2-52677,2

SD, Standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

Tabela 8. Produkcija citokina u kulturi MČPK bolesnika sa aktivnim RA suplementiranoj sa 10nM rastvorom alfa-kalcidola i 400nM rastvorom metilprednizolona zajedno

Citokin	n	Srednja vrednost (pg/ml) ± SD	Medijana (IQR)	Min-Max
IL 4	16	49,4 ± 70,4	23,3 (38,2)	4,2-273,3
IL 6	16	1873,6 ± 2432,6	360,1 (2893,2)	68,4-9619,5
IL 10	16	358,6 ± 412,2	237,7 (251,7)	8,1-1355,4
IL 17	16	14,6 ± 18,1	6,9 (18,0)	0,7-65,9
IL 21	16	65,9 ± 52,0	53,7 (66,4)	10,2-205,5
TNF α	16	343,7 ± 835,9	131,9 (187,3)	15,6-3431,4
TGF β	16	1504,2 ± 1119,2	1156,4 (1716,3)	256,2-4561,9
IFN γ	16	9056,2 ± 16449,5	2953,4 (9087,7)	374,9-64903,1

SD, Standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

Tabela 9. Produkcija citokina u kulturi MČPK bolesnika sa aktivnim RA suplementiranoj sa 800nM rastvorom metilprednizolona

Citokin	n	Srednja vrednost (pg/ml) ± SD	Medijana (IQR)	Min-Max
IL 4	16	23,2 ± 23,4	13,4 (25,3)	2,6-77,7
IL 6	16	1437,5 ± 2432,7	360,2 (1625,0)	81,5-9394,1
IL 10	16	343,0 ± 460,9	153,3 (291,2)	9,2-1375,4
IL 17	16	46,9 ± 67,5	16,4 (60,2)	1,7-206,3
IL 21	16	1003,1 ± 962,0	822,2 (2111,1)	22,5-2514,6
TNF α	16	481,5 ± 950,0	244,4 (456,2)	20,9-3840,8
TGF β	16	1508,4 ± 1026,1	1398,4 (839,0)	80,5-4351,5
IFN γ	16	12871,4 ± 17728,4	2766,1 (18781,7)	607,5-62500,0

SD, Standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

Tabela 10. Produkcija citokina u kulturi MČPK bolesnika sa aktivnim RA suplementiranoj sa 10nM rastvorom **alfakalcidola** i 800nM rastvorom **metilprednizolona** zajedno

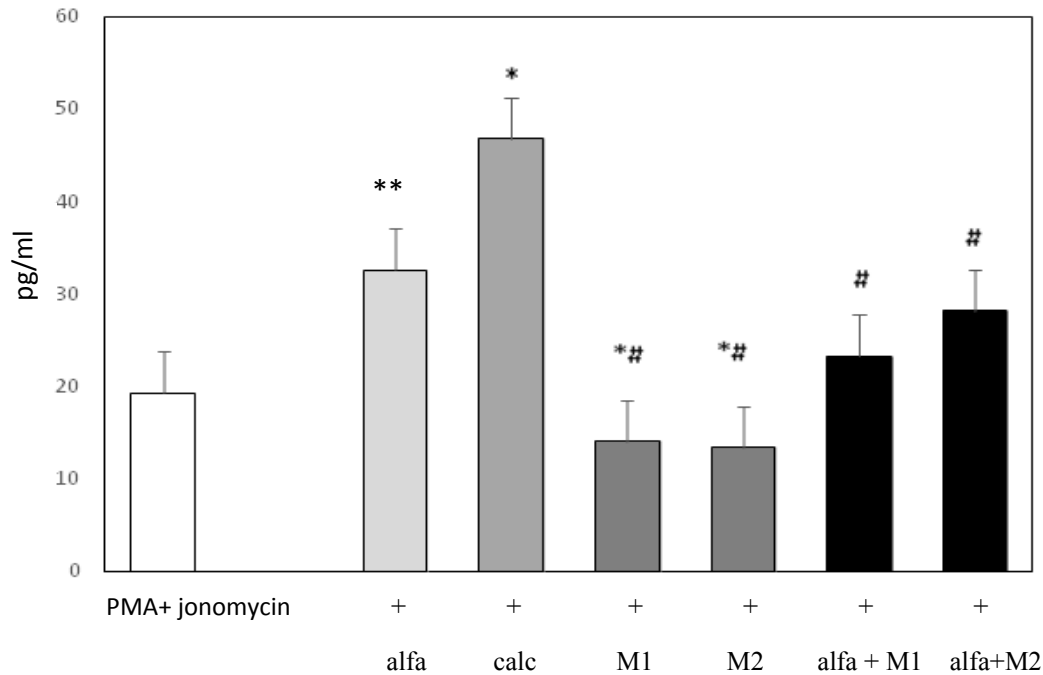
Citokin	n	Srednja vrednost (pg/ml)		
		± SD	Medijana (IQR)	Min-Max
IL 4	16	42,3 ± 43,3	28,2 (39,5)	5,2-139,5
IL 6	16	1462,9 ± 2608,1	325,7 (2087,2)	68,4-9619,5
IL 10	16	428,5 ± 477,6	300,6 (577,2)	7,9-1399,6
IL 17	16	14,8 ± 18,9	5,5 (20,6)	1,5-61,0
IL 21	16	104,9 ± 111,7	47,4 (97,4)	18,9-423,4
TNF α	16	169,2 ± 197,9	102,3(178,4)	18,5-713,1
TGF β	16	1452,8 ± 948,6	1488,9 (1168,2)	211,0-3884,2
IFN γ	16	8348,0 ± 18483,8	1336,2 (7420,5)	435,9-70771,0

SD, Standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

5.3.2. Efekat različite *in vitro* suplementacije na produkciju IL-4 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA

In vitro suplementacija kultivacionog medijuma dovela je do statistički značajne promene stimulisane produkcije IL-4 u grupi bolesnika sa aktivnim RA.

U kulturi mononuklearnih ćelija bez suplementacije (kontrolni tretman) produkcija IL-4 iznosila je 19.3(66.4) pg/ml. U kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi koja je suplementirana alfakalcidolom došlo je do visoko statistički značajnog povećanja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (19.3 vs 32.6, $p < 0.0001$). U ćelijama suplementiranim kalcitriolom došlo je, takodje, do visoko statistički značajnog povećanja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (19.3 vs 46.8, $p < 0.0001$) ali u odnosu na suplementaciju alfakalcidolom nije bilo statističke značajnosti ($p > 0.05$). Nakon suplementacije metilprednizolonom, u obe koncentracije, došlo je do statistički značajnog smanjenja produkcije IL-4 u odnosu na kontrolni tretman (19.3 vs 14, $p = 0.017$ i 19.3 vs 13.4, $p = 0.002$), dok je rezultat u oba slučaja bio statistički značajno niži u odnosu na suplementaciju alfakalcidolom. Takodje, istovremeni tretman alfakalcidolom i metilprednizolonom, u obe koncentracije, doveo je do porasta produkcije ovog citokina ali bez statističke značajnosti, u odnosu na kontrolni tretman (19.3 vs 23.3, $p = 0.3$ i 19.3 vs 28.2, $p = 0.8$), dok je u odnosu na ćelije suplementirane alfakalcidolom postojala statistička značajnost ($p < 0.05$).



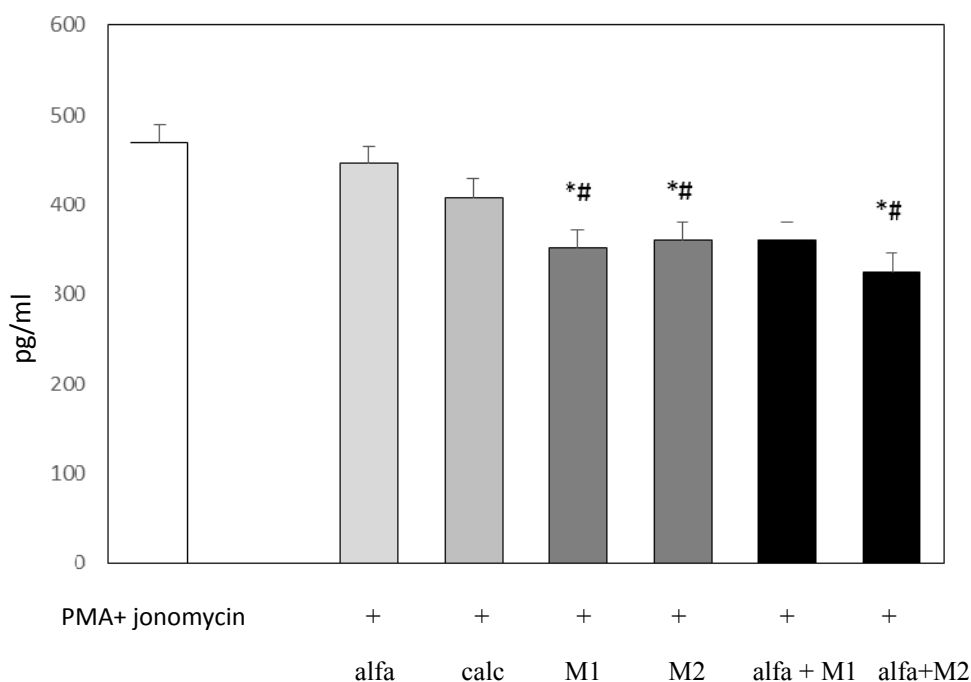
Grafik 9. Produkcija IL-4 u suplementiranim stimulisanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi bolesnika sa RA u kulturi. PMA+jonomycin – stimulacija; alfa – tretman rastvorom alfakalcidola finalne koncentracije 10nM, calc – tretman rastvorom kalcitriola finalne koncentracije 10nM; M1 - tretman rastvorom metilprednizolona finalne koncentracije 400nM; alfa+M1 - tretman rastvorom alfakalcidola (10nM) i metilprednizolona (400nM) zajedno. vrednosti predstavljene kao ili Median (IQR); * p<0.05 u odnosu na stimulisanu produkciju; ** p<0.01 u odnosu na stimulisanu produkciju; # p<0.05 u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM) ; ## p<0.01 u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM)

5.3.3. Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IL-6 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA

In vitro suplementacija kultivacionog medijuma dovela je do statistički značajne promene stimulisane produkcije IL-6 u grupi bolesnika sa aktivnim RA.

U kulturi mononuklearnih ćelija bez suplementacije (kontrolni tretman) produkcija IL-6 iznosila je 469.6 (2353.5) pg/ml. U kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi suplementiranih alfakalcidolom došlo je do smanjenja produkcije ovog citokina u

odnosu na kontrolni tretman (469.6 vs 445, $p=0.4$). Produkcija IL-6 u ćelijama suplementiranim kalcitriolom je, takodje, smanjena u odnosu na kontrolni tretman (469.6 vs 408.3 $p=0.4$). Nije zabeležena statistička značajnost u poredjenju sa efektima suplementacije alfakalcidolom. Nakon suplementacije metilprednizolonom, došlo je do statistički značajnog smanjenja produkcije IL-6 u odnosu na kontrolni tretman (469.6 vs 351.8, $p=0.002$ i 469.6 vs 360.2, $p=0.001$) i rezultat je bio statistički značajno različit od tretmana alfakalcidolom ($p<0.05$). Takodje, istovremeni tretman alfakalcidolom i metilprednizolonom, doveo je do pada produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (469.6 vs 360.1, $p=0.12$ i 469.6 vs 325.7 $p=0.011$). Istovremeni tretman alfakalcidolom i metilprednizolonom je, isto tako, doveo do značajno niže produkcije od suplementacije samo alfakalcidolom ($p<0.05$).

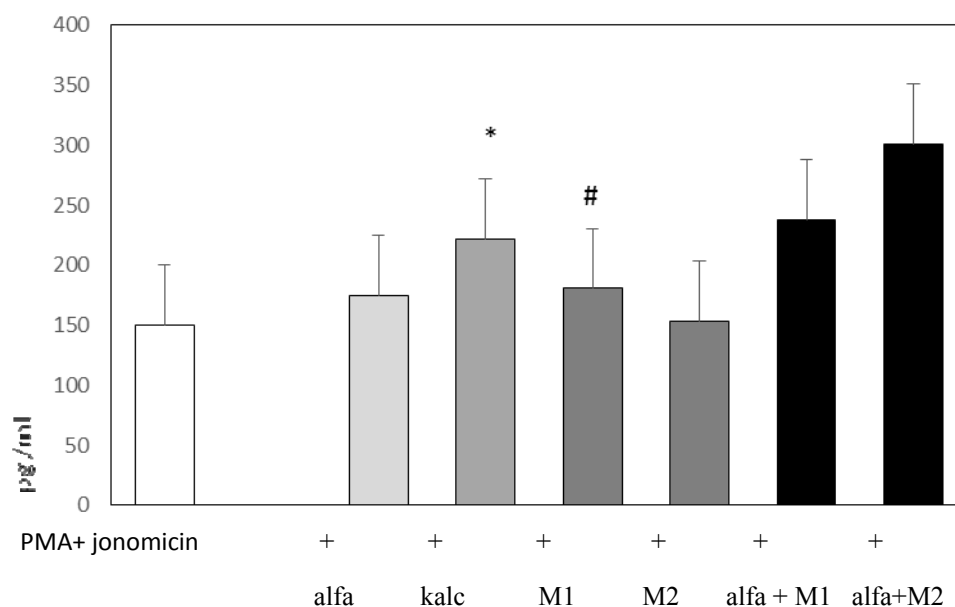


Grafik 10. Produkcija IL-6 u suplementiranim stimulisanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi bolesnika sa RA u kulturi. PMA+jonomicin – stimulacija; alfa – tretman rastvorom alfakalcidola finalne koncentracije 10nM, calc – tretman rastvorom kalcitriola finalne koncentracije 10nM; M1 - tretman rastvorom metilprednizolona finalne koncentracije 400nM; alfa+M1 - tretman rastvorom alfakalcidola (10nM) i metilprednizolona (400nM) zajedno. Vrednosti su predstavljene kao Median (IQR); * $p<0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju; ** $p<0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju; # $p<0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM) ; ## $p<0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM)

5.3.4. Efekat in vitro suplementacije na produkciju IL-10 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA

In vitro suplementacija kultivacionog medijuma sa različitim, dovela je do statistički značajne promene stimulisane produkcije IL-10 u grupi bolesnika sa aktivnim RA.

U kulturi mononuklearnih ćelija bez suplementacije (kontrolni tretman) produkcija IL-10 iznosila je 150.3 (302.0) pg/ml. U kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi koja je suplementirana alfa-kalcidolom došlo je do povećanja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (150.3 vs 174.9, $p=0.09$). Produkcija IL-10 u ćelijama suplementiranim kalcitriolom bila je značajno veća od produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (150.3 vs 221.7, $p=0.03$). Nakon suplementacije metilprednizolonom, nije došlo do statistički značajnog povećanja produkcije IL-10 u odnosu na kontrolni tretman (150.3 vs 180.6 $p=0.535$) ali je razlika dostigla značajnost u odnosu na tretman alfa-kalcidolom ($p<0.05$). Takođe, istovremeni tretman alfa-kalcidolom i metilprednizolonom, doveo je do porasta produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (150.3 vs 237.7, $p=0.134$ i 150.3 vs 300.6, $p=0.272$).



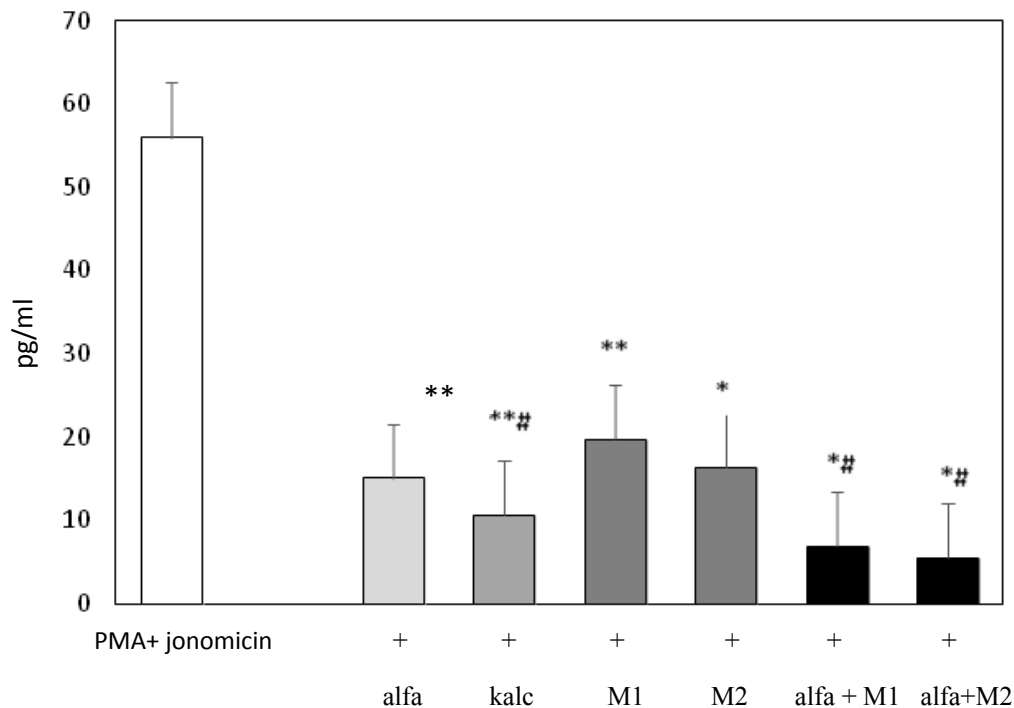
Grafik 11. **Produkcija IL-10 u suplementiranim stimulisanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi bolesnika sa RA u kulturi.** PMA+jonomycin – stimulacija; alfa – tretman rastvorom alfa-kalcidola finalne koncentracije 10nM, kalk – tretman rastvorom kalcitriola finalne koncentracije 10nM; M1 - tretman rastvorom metilprednizolona finalne koncentracije 400nM;

alfa+M1 - tretman rastvorom alfakalcidola (10nM) i metilprednizolona (400nM) zajedno. vrednosti predstavljene kao Median (IQR); * $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju; ** $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju; # $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM); ## $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM)

5.3.5. Efekat različite in vitro suplementacije na produkciju IL-17 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA

In vitro suplementacija kultivacionog medijuma sa različitim, dovela je do statistički značajne promene stimulisane produkcije IL-17 u grupi bolesnih sa aktivnim RA.

U kulturi mononuklearnih ćelija bez suplementacije (kontrolni tretman) produkcija IL-17 iznosila je 56 (227.2)pg/ml. U kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi grupe koja je suplementirana alfakalcidolom došlo je do visoko statistički značajnog smanjenja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (56 vs 15.1, $p = 0.001$). Produkcija IL-17 u ćelijama suplementiranim kalcitriolom bila je, takodje, visoko statistički značajnog manja u odnosu na kontrolni tretman (56 vs 10.7, $p < 0.0001$) ali i u odnosu na tretman alfakalcidolom ($p < 0.05$). Nakon suplementacije metilprednizolonom u obe koncentracije, došlo je do statistički značajnog smanjenja produkcije IL-17 u odnosu na kontrolni tretman (56 vs 19.7, $p = 0.0001$ i 56 vs 16.4, $p = 0.001$). Takodje, istovremeni tretman alfakalcidolom i metilprednizolonom, u obe koncentracije, doveo je do dodatnog statistički značajnog smanjenja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (56 vs 6.9, $p = 0.0001$ i 56 vs 5.5, $p = 0.0001$). Efekti istovremenog tretmana alfakalcidolom i metilprednizolonom su, isto tako, pokazali značajno nižu produkciju od tretmana samo alfakalcidolom ($p < 0.05$)



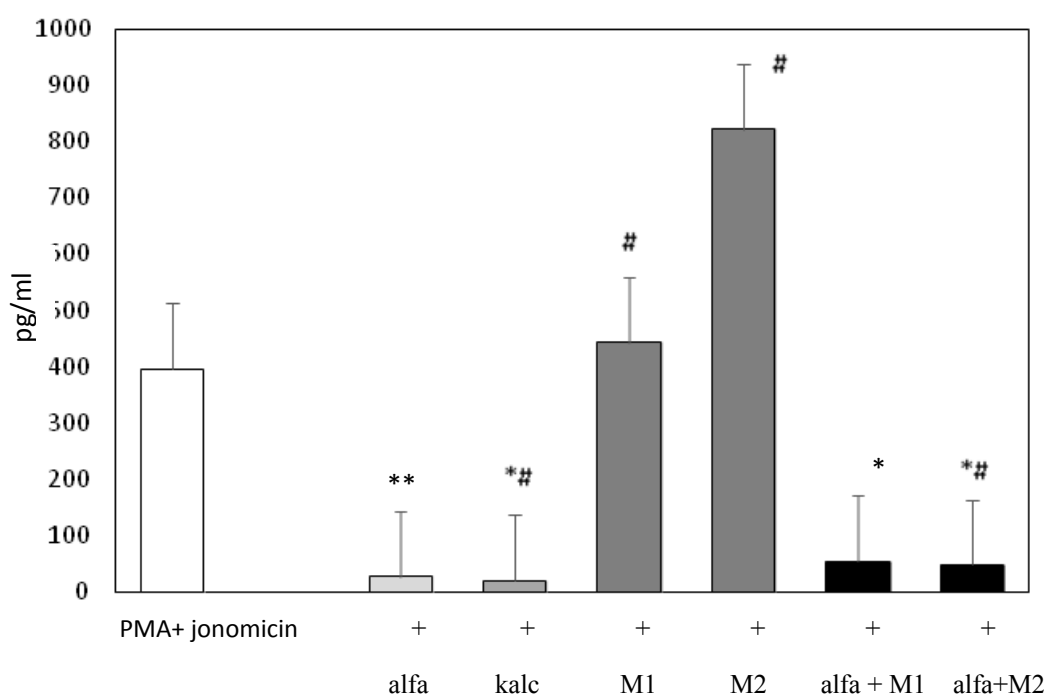
Grafik 12. Produkcija IL-17 u suplementiranim stimulisanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi bolesnika sa RA u kulturi. PMA+ionomicin – stimulacija; alfa – tretman rastvorom alfa-kalcidola finalne koncentracije 10nM, kalk – tretman rastvorom kalcitriola finalne koncentracije 10nM; M1 - tretman rastvorom metilprednizolona finalne koncentracije 400nM; alfa+M1 - tretman rastvorom alfa-kalcidola (10nM) i metilprednizolona (400nM) zajedno. vrednosti predstavljene kao Median (IQR); * p<0.05 u odnosu na stimulisanu produkciju; ** p<0.01 u odnosu na stimulisanu produkciju; # p<0.05 u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfa-kalcidol (10nM) ; ## p<0.01 u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfa-kalcidol (10nM)

5.3.6. Efekat različite in vitro stimulacije na produkciju IL-21 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA

In vitro suplementacija kultivacionog medijuma dovela je do statistički značajne promene stimulisane produkcije IL-21 u grupi bolesnih sa RA.

U kulturi mononuklearnih ćelija bez suplementacije (kontrolni tretman) produkcija IL-21 iznosila je 396.2 (1439.6) pg/ml. U kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi koja je suplementirana alfa-kalcidolom došlo je do visoko statistički značajnog smanjenja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (396.2 vs 26.3, p=0.001). Produkcija IL-21 u ćelijama suplementiranim kalcitriolom došlo je, takodje, do statistički značajnog smanjenja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni

tretman (396.2 vs 19.7, $p=0.001$) i u odnosu na tretman alfakalcidolom ($p<0.05$). Nakon suplementacije metilprednizolonom, u obe koncentracije, došlo je do povećanja produkcije IL-21 u odnosu na kontrolni tretman (396.2 vs 443.3, $p=0.877$ i 396.2 vs 822.2, $p=0.087$) dok je produkcija bila statistički značajno veća od tretmana alfakalcidolom ($p<0.05$). Međutim, istovremeni tretman alfakalcidolom i metilprednizolonom, u obe koncentracije, doveo je do statistički značajnog smanjenja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (396.2 vs 53.7, $p=0.001$ i 396.2 vs 47.4, $p=0.006$). Također, efekti istovremenog tretmana alfakalcidolom i metilprednizolonom u većoj koncentraciji su bili značajno drugačiji u odnosu na tretman samim alfakalcidolom ($p<0.05$).

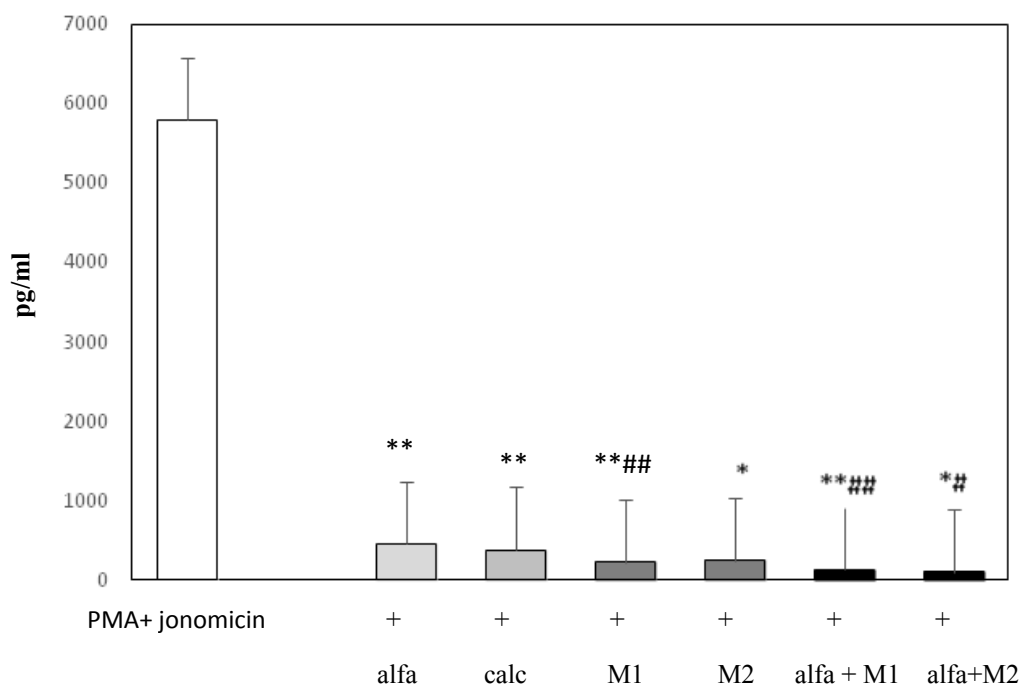


Grafik 13. Produkcija IL-21 u suplementiranim stimulisanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi bolesnika sa RA u kulturi. PMA+jonomicin – stimulacija; alfa – tretman rastvorom alfakalcidola finalne koncentracije 10nM, calc – tretman rastvorom kalcitriola finalne koncentracije 10nM; M1 - tretman rastvorom metilprednizolona finalne koncentracije 400nM; alfa+M1 - tretman rastvorom alfakalcidola (10nM) i metilprednizolona (400nM) zajedno. vrednosti predstavljene kao Median (IQR); * $p<0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju; ** $p<0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju; # $p<0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM) ; ## $p<0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM)

5.3.7. Efekat različite in vitro stimulacije na produkciju TNF- α u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA

In vitro suplementacija kultivacionog medijuma, dovela je do statistički značajne promene stimulisane produkcije TNF- α u grupi bolesnika sa aktivnim RA.

U kulturi mononuklearnih ćelija bez suplementacije (kontrolni tretman) produkcija TNF- α iznosila je 5795.9 (23342.1) pg/ml. U kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi koja je suplementirana alfa-kalcidolom došlo je do visoko statistički značajnog smanjenja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (5795.9 vs 453.6, $p=0.002$). U ćelijama suplementiranim kalcitriolom došlo je, takodje, do visoko statistički značajnog smanjenja produkcije TNF- α u odnosu na kontrolni tretman (5795.9 vs 374.5, $p=0.003$). Nakon suplementacije metilprednizolonom, sa obe koncentracije, došlo je do statistički značajnog smanjenja produkcije TNF- α u odnosu na kontrolni tretman (5795.9 vs 224.3 $p=0.0001$ i 5795.9 vs 244.4, $p=0.001$) a rezultat je bio i statistički značajno niži od suplementacije alfa-kalcidolom ($p<0.05$). Takodje, istovremeni tretman alfa-kalcidolom i metilprednizolonom, sa obe koncentracije, doveo je do statistički značajnog smanjenja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (5795.9 vs 131.4, $p<0.0001$ i 5795.9 vs 102.3, $p=0.0001$). Sniženje u produkciji TNF- α , bilo je značajno izraženije kada je primenjen istovremeni tretman, alfa-kalcidola sa obe koncentracije metilprednizolona, u odnosu na efekte samog alfa-kalcidola u kulturi stimulisanih ćelija ($p<0.05$).



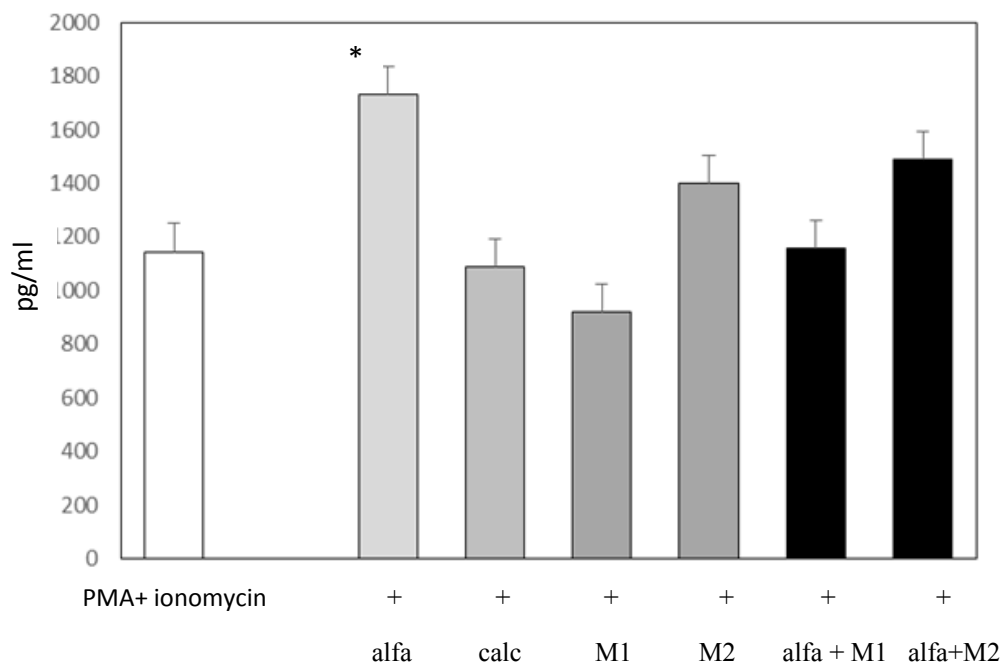
Grafik 14. Produkcija TNF- α u suplementiranim stimulisanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi bolesnika sa RA u kulturi. PMA+jonomicin – stimulacija; alfa – tretman rastvorom alfa-kalcidola finalne koncentracije 10nM; calc – tretman rastvorom kalcitriola finalne koncentracije 10nM; M1 - tretman rastvorom metilprednizolona finalne koncentracije 400nM; alfa+M1 - tretman rastvorom alfa-kalcidola (10nM) i metilprednizolona (400nM) zajedno. vrednosti predstavljene kao Median (IQR); * p<0.05 u odnosu na stimulisanu produkciju; ** p<0.01 u odnosu na stimulisanu produkciju; # p<0.05 u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfa-kalcidol (10nM) ; ## p<0.01 u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfa-kalcidol (10nM).

5.3.8. Efekat različitih in vitro tretmana na produkciju TGF- β u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA

In vitro suplementacija kultivacionog medijuma, dovela je do statistički značajne promene stimulisane produkcije TGF- β u grupi bolesnika sa aktivnim RA.

U kulturi mononuklearnih ćelija bez suplementacije (kontrolni tretman) produkcija TGF- β iznosila je 1144.7 (1456.3)pg/ml. U kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi koja je pored suplementirana alfa-kalcidolom došlo je do visoko statistički značajnog povećanja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (1144.7 vs 1729.9, p<0.0001). U ćelijama suplementiranim kalcitriolom nije došlo do značajne promene produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (1144.7 vs 1087.4, p=0.535). Nije bilo značajne razlike u produkciji TGF- β nakon suplementacije metilprednizolonom u obe koncentracije, bez (1144.7 vs 918.4,

p=0.959; 1144.7 vs 1389.4, p=0.496) ili sa (1144.7 vs 1156.4, p=0.173 i 1144.7 vs 1488.9, p=0.552) alfakalcidolom.



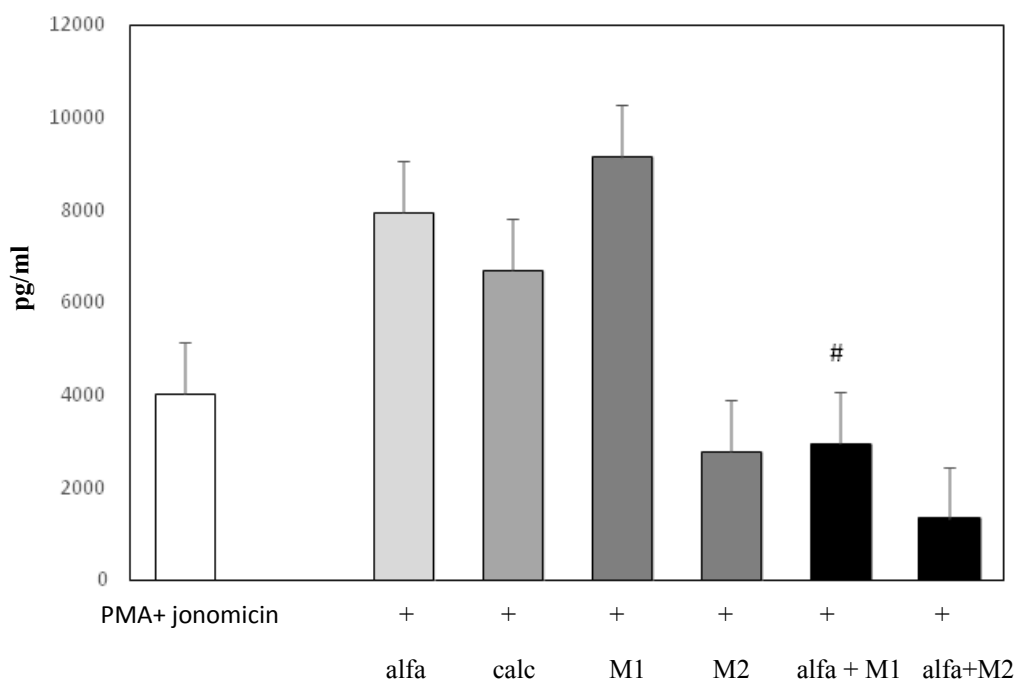
Grafik 15. Produkcija TGF- β u suplementiranim stimulisanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi bolesnika sa RA u kulturi. PMA+jonomicin – stimulacija; alfa – tretman rastvorom alfakalcidola finalne koncentracije 10nM, calc – tretman rastvorom kalcitriola finalne koncentracije 10nM; M1 - tretman rastvorom metilprednizolona finalne koncentracije 400nM; alfa+M1 - tretman rastvorom alfakalcidola (10nM) i metilprednizolona (400nM) zajedno. vrednosti predstavljene kao Median (IQR); * p<0.05 u odnosu na stimulisanu produkciju; ** p<0.01 u odnosu na stimulisanu produkciju; # p<0.05 u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM) ; ## p<0.01 u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM)

5.3.9. Efekat različite in vitro stimulacije na produkciju IFN- γ u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA

In vitro suplementacija kultivacionog medijuma, dovela je do statistički značajne promene stimulisane produkcije IFN- γ u grupi bolesnika sa aktivnim RA.

U kulturi mononuklearnih ćelija bez suplementacije (kontrolni tretman) produkcija IFN- γ iznosila je 4014.7 (19906.7)pg/ml. U kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi koja je suplementirana alfakalcidolom došlo je do povećanja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman sto je bilo na granici statističke značajnosti

(4014.7 vs 7940, $p=0.056$). U ćelijama suplementiranim kalцитriolom došlo je, takodje, do blagog povećanja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (4014.7 vs 6701.3, $p=0.469$). Nakon suplementacije metilprednizolonom niže koncentracije, došlo je do povećanja produkcije IFN- γ u odnosu na kontrolni tretman (4014.7 vs 9144.4, $p=0.163$) dok je nakon suplementacije metilprednizolonom veće koncentracije, produkcija imala vrednost veoma sličnu stimulisanoj produkciji bez tretmana (4014.7 vs 2766, $p=0.307$). Istovremeni tretman alfakalcidolom i metilprednizolonom, doveo je do smanjenja produkcije ovog citokina u odnosu na kontrolni tretman (4014.7 vs 2953.4, $p=0.569$; 4014.7 vs 1336.2, $p=0.594$), s tim da je u odnosu na tretman alfakalcidolom produkcija IFN- γ bila značajno niža u kulturi sa nižom koncentracijom metilprednizolona ($p=0.015$).



Grafik 16. Produkcija IFN- γ u suplementiranim stimulisanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi bolesnika sa RA u kulturi. PMA+jonomycin – stimulacija; alfa – tretman rastvorom alfakalcidola finalne koncentracije 10nM, calc – tretman rastvorom kalцитriola finalne koncentracije 10nM; M1 - tretman rastvorom metilprednizolona finalne koncentracije 400nM; alfa+M1 - tretman rastvorom alfakalcidola (10nM) i metilprednizolona (400nM) zajedno. vrednosti predstavljene kao Median (IQR); * $p<0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju; ** $p<0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju; # $p<0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM) ; ## $p<0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju sa tretmanom alfakalcidol (10nM)

5.4. PRODUKCIJA CITOKINA U KULTURI MONONUKLEARNIH ČELIJA PERIFERNE KRVI BOLESNIKA SA AKTIVNIM RA PRE I POSLE TERAPIJE ALFAKALCIDOLOM

Kako je već prethodno objašnjeno, ispitivanje produkcije citokina mononuklearnih ćelija periferne krvi vršeno je ELISA metodom u svih bolesnika sa aktivnim reumatoidnim artritisom pre započinjanja terapijskog protokola alfa-kalcidolom kao i nakon 12 nedelja oralne primene alfa-kalcidola u dnevnoj dozi od 2 mcg.

Mononuklearne ćelije periferne krvi kontrolnih zdravih osoba i bolesnika sa aktivnim RA su kultivisane 48h, sa PMA-jonomycin stimulacijom. Izmerene vrednosti stimulisane produkcije proinflammatoryh i antiinflammatoryh citokina prikazane su u tabelama 11-15.

Tabela 11. Stimulisana produkcija citokina MČPK bolesnika sa RA u kulturi **pre terapije**

	n	Srednja vrednost (pg/ml) ± SD	Medijana (IQR)	Min-Max
IL 4	16	58,4 ± 84,8	19,3 (66,4)	2,7-284,8
IL 6	16	2146,6 ± 3289,8	469,6 (2353,5)	160,1-12753,6
IL 10	16	319,4 ± 476,9	150,3 (302,0)	4,0-1795,5
IL 17	16	111,6 ± 117,6	56,0 (227,2)	3,3-296,7
IL 21	16	737,2 ± 918,4	396,2 (1439,6)	10,5-2647,0
TNF α	16	11592,5 ± 15488,8	5795,9 (23342,1)	44,6-47376,7
TGF β	16	1229,0 ± 754,6	1144,7 (1456,3)	200,5-2424,6
IFN γ	16	11007,7 ± 14591,5	4014,7 (19906,7)	152,6-50410,4

SD, Standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

Tabela 12. Stimulisana produkcija citokina MČPK zdravih **kontrola** u kulturi

Citokin	n	Srednja vrednost (pg/ml) ± SD	Medijana (IQR)	Min-Max
IL 4	20	264,4 ± 352,3	134,6 (142,5)	39,6-1466,0
IL 17	20	433,3 ± 203,4	462,0 (304,7)	2,6-684,3
IL 21	20	7575,4 ± 4893,3	7817,8 (6603,5)	1043,4-17794,8
TNF α	20	4925,5 ± 1409,0	4966,4 (2650,6)	3013,4-7462,9
IFN γ	20	559,4 ± 157,4	568,4 (299,4)	301,2-814,2

SD, Standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

Nakon 12 nedelje svakodnevne primene alfakalcidola u dozi od 2 mcg dnevno, došlo je do veoma značajnih promena stimulisane produkcije pojedinih citokina u kulturama mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA. Rezultati su prikazani u tabeli 13.

Tabela 13. Stimulisana produkcija citokina MČPK bolesnika sa RA u kulturi nakon 12 nedelja terapije alfakalcidolom -W12

Citokin	n	Srednja vrednost (pg/ml) ± SD	Medijana (IQR)	Min-Max
IL 4	16	94,2 ± 97,5	61,9 (129,3)	2,0-362,8
IL 6	16	2016,0 ± 3410,3	309,4 (2607,1)	33,0-12638,2
IL 10	16	589,1 ± 479,1	617,7 (898,1)	4,7-1313,1
IL 17	16	64,1 ± 86,7	19,0 (120,5)	1,0-266,5
IL 21	16	1260,8 ± 1814,8	497,0 (1575,9)	9,9-7021,2
TNF α	16	5173,1 ± 6806,3	2501,3 (6283,2)	39,5-24704,1
IFN γ	16	23975,9 ± 24963,2	17806,8 (436959,6)	178,9-69461,5
TGF β	16	1604,3 ± 1145,2	1613,4 (2169,2)	153,0-3756,6

SD, Standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

Stimulisana produkcija citokina u kulturi bolesnika sa aktivnim RA značajno se razlikovala u odnosu na stimulisanu produkciju citokina kontrolne grupe zdravih.

Tabela 14. Odnos stimulisane produkcije citokina u kulturi MČPK ćelija bolesnika sa RA pre terapije alfakalcidolom i kontrola

Citokin	Pacijenti	Kontrole	P vrednost
IL 4	19,3 (66,4)	134,6 (142,5)	< 0,0001
IL 17	56,0 (227,3)	462,0 (304,7)	< 0,0001
IL 21	396,2 (1439,6)	7817,8 (6603,5)	< 0,0001
TNF α	5796,0 (23342,1)	4966,4 (2650,6)	0,863
IFN γ	4014,7 (19906,7)	568,4 (299,4)	0,012

Vrednosti prikazane kao medijana (IQR).

Nakon dvanaestonedeljne terapije alfakalcidolom došlo je do značajne promene u stimulisanoj produkciji proinflamatornih i antiinflamatornih citokina u kulturi bolesnika sa RA.

Tabela 15. Stimulisana produkcija citokina u kulturi MČPK ćelija bolesnika sa RA pre i nakon 12 nedelja uzimanja alfakalcidiola

Citokin	N*	Pre	Posle	Razlika**	P vrednost
IL 4	16/16	19,3 (66,4)	61,9 (129,3)	-32,4 ± 112,9	0,156
IL 6	16/ 16	469,6 (2353,5)	309,4 (2607,1)	176,9 ± 195,1	0,001
IL 10	16/ 16	150,3 (302,0)	617,7 (898,1)	-251,0 ± 466,7	0,031
IL 17	16/16	56,0 (227,3)	19,0 (120,5)	47,5 ± 62,8	< 0,0001

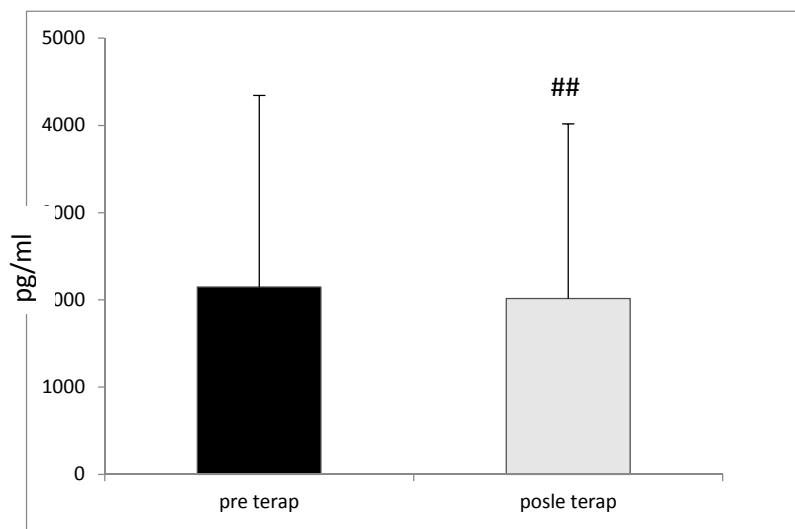
IL 21	16/16	396,2 (1439,6)	497,0 (1575,89)	-477,1 ± 1583,9	0,156
TNF α	16/16	5796,0 (23342,1)	2501,3 (6283,2)	7175,8 ± 11330,6	0,015
TGF β	16/16	1144,7 (1456,3)	1613,4 (2169,2)	-322,8 ± 644,8	0,048
IFN γ	16/16	4014,7 (19906,7)	17806,8 (436959,6)	-13897,8 ± 17495,5	0,001

*Broj parova/broj pacijenata

**Srednja vrednost \pm SD razlika u odnosu na koncentracije pre alfa-kalcidola.

5.4.1. Poredjenje in vitro stimulisane produkcije citokina u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih kontrola i bolesnika sa RA pre i posle terapije alfa-kalcidolom

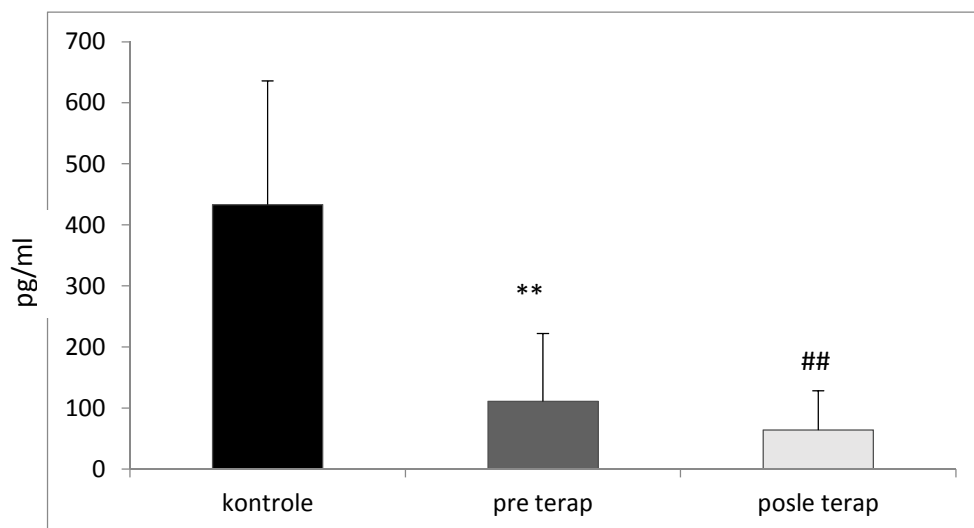
Stimulisana produkcija proinflatornog citokina IL-6 u grupi pacijenata pre terapije iznosila je 2146.6 ± 3289.8 pg/ml, dok je nakon terapije alfa-kalcidolom došlo do statistički veoma značajnog pada koncentracije ovog citokina na 2016 ± 3410.3 (p=0.001).



Grafik 17. Produkcija IL-6 u stimulisanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi **bolesnika** sa RA u kulturi pre i nakon dvanaestonedeljne terapije alfa-kalcidolom. Vrednosti predstavljene kao srednja vrednost \pm SD; * p<0.05 u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; ** p<0.01 u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; # p<0.05 u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfa-kalcidolom (2 μ g/dnevno) ; ## p<0.01 u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfa-kalcidolom (2 μ g/dnevno).

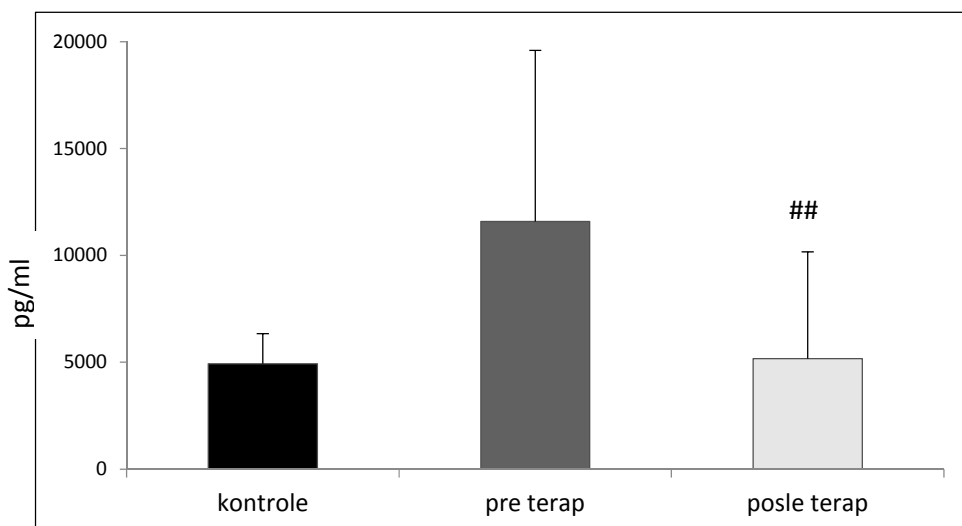
U kontrolnoj grupi zdravih osoba produkcija drugog proinflatornog i veoma važnog citokina IL-17 iznosila je 433.3 ± 203.4 a u grupi bolesnika sa aktivnim RA

bila je statistički značajno niža 111.6 ± 117.6 , ($p < 0.0001$). Nakon terapije alfa-kalcidolom došlo je do statistički značajnog pada produkcije ovog citokina do vrednosti od 64.1 ± 86.7 ($p < 0.0001$).



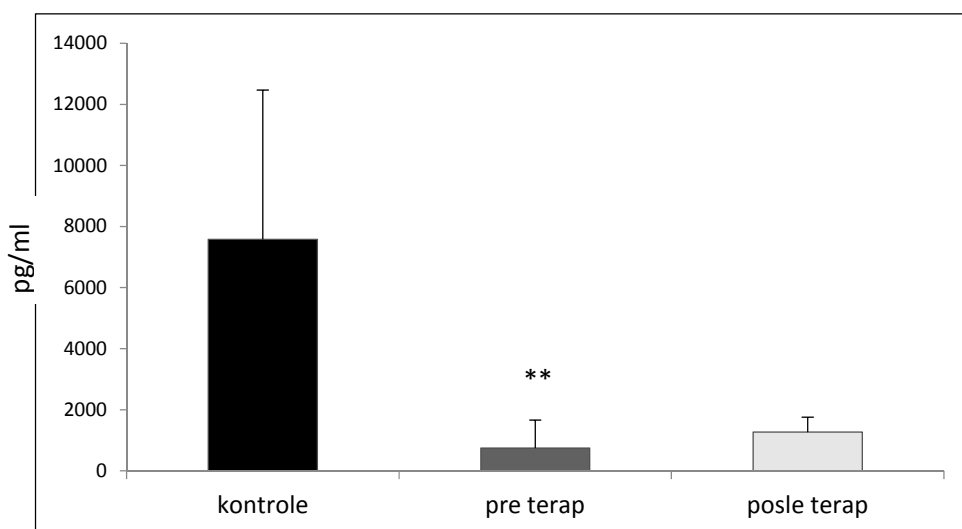
Grafik 18. Produkcija IL-17 u stimulisanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi bolesnika u kulturi pre i nakon dvanaestonedeljne terapije alfa-kalcidolom. Vrednosti predstavljene kao srednja vrednost \pm SD; * $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; ** $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; # $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfa-kalcidolom ($2 \mu\text{g}/\text{dnevno}$); ## $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfa-kalcidolom ($2 \mu\text{g}/\text{dnevno}$).

Takodje, slični rezultati su dobijeni i kada je u pitanju TNF-a. Stimulisana produkcija TNF-a u kulturi grupe zdravih osoba bila je 4925.5 ± 1409.0 , a kod bolesnika sa RA 11592 ± 15488.8 ova razlika nije bila statistički značajna ($p = 0.863$). Nakon dvanaestonedeljne terapije alfa-kalcidolom, produkcija ovog proinflatarnog citokina u kulturi bolesnika bila je statistički značajno niža u odnosu na vrednosti pre terapije i iznosila je 5173.1 ± 6806.3 ($p = 0.015$), sto je bilo blisko vrednostima dobijenim u grupi zdravih kontrola.



Grafik 19. Produkcija TNF- α u stimulisanim mononuklearnim celijama periferne krvi **bolesnika** u kulturi pre i nakon dvanaestonedeljne terapije alfakalcidolom. Vrednosti predstavljene kao srednja vrednost \pm SD; * $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; ** $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; # $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfakalcidolom ($2\mu\text{g/dnevno}$); ## $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfakalcidolom ($2\mu\text{g/dnevno}$).

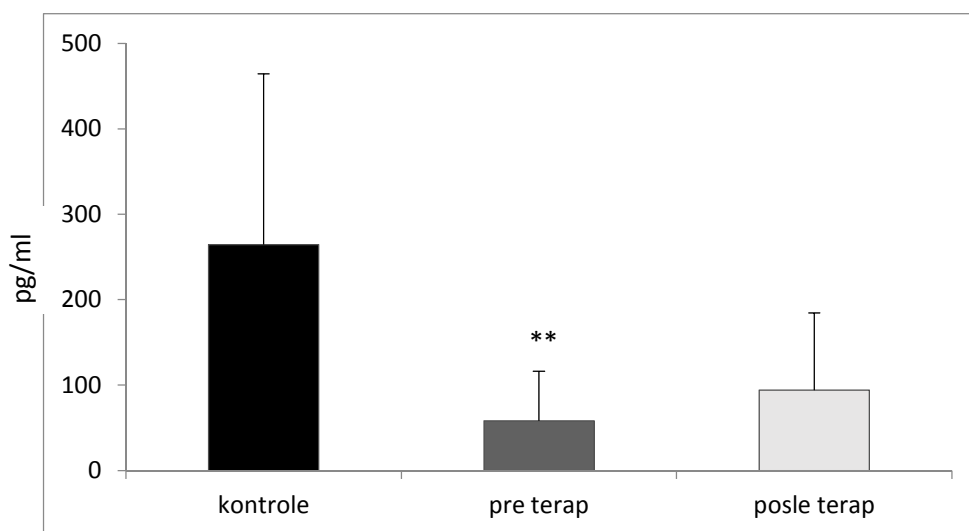
Koncentracija IL-21 u kontrolnoj grupi zdravih je iznosila 7575.4 ± 4893.3 , dok je u grupi bolesnika bila statistički značajno manja 737.2 ± 918.4 ($p < 0.0001$). Nakon studijskog tretmana došlo je do povećanja stimulisane produkcije ovog citokina (1260.8 ± 1814.8) ali ova razlika nije dostigla nivo statističke značajnosti ($p = 0.156$).



Grafik 20. Produkcija IL-21 u stimulisanim mononuklearnim celijama periferne krvi **kontrola** i **bolesnika** u kulturi pre i nakon dvanaestonedeljne terapije alfakalcidolom. Vrednosti predstavljene kao srednja vrednost \pm SD; * $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; ** $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; # $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfakalcidolom ($2\mu\text{g}/\text{dnevno}$); ## $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfakalcidolom ($2\mu\text{g}/\text{dnevno}$).

Rezultati su pokazali izuzetno važne efekte terapije alfakalcidolom na produkciju antiinflamatornih citokina.

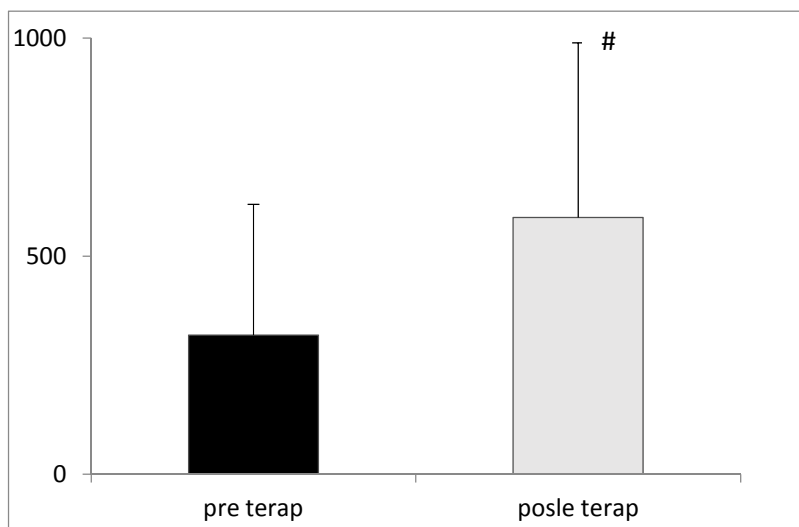
Produkcija IL-4 u kontrolnoj grupi zdravih iznosila je 264.4 ± 352.3 dok je u grupi bolesnika pre tretmana alfakalcidolom bila statistički značajno niža ($58,4 \pm 84,8$, $p < 0.0001$). Nakon dvanaestonedeljne terapije alfakalcidolom došlo je do blagog porasta nivoa produkcije IL-4, ali ovaj rezultat nije dostigao statističku značajnost (94.2 ± 97.5 , $p = 0.156$).



Grafik 21. Produkcija IL-4 u stimulisanim mononuklearnim celijama periferne krvi **kontrola** i **bolesnika** u kulturi pre i nakon dvanaestonedeljne terapije alfakalcidolom. Vrednosti predstavljene kao srednja vrednost \pm SD; * $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; ** $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; # $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfakalcidolom ($2\mu\text{g}/\text{dnevno}$); ## $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfakalcidolom ($2\mu\text{g}/\text{dnevno}$).

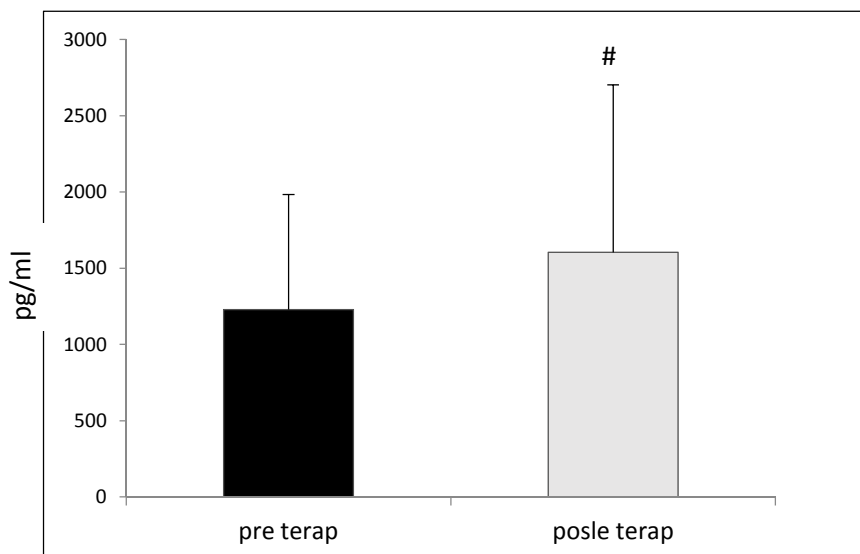
U grupi bolesnika sa RA, IL-10 produkcija iznosila je 319.4 ± 476.9 pre terapije alfakalcidolom. Nakon terapije alfakalcidolom došlo je do statistički značajnog

porasta produkcije antiinflamatornog citokina IL-10 na vrednost 589.1 ± 479.1 ($p=0.031$).



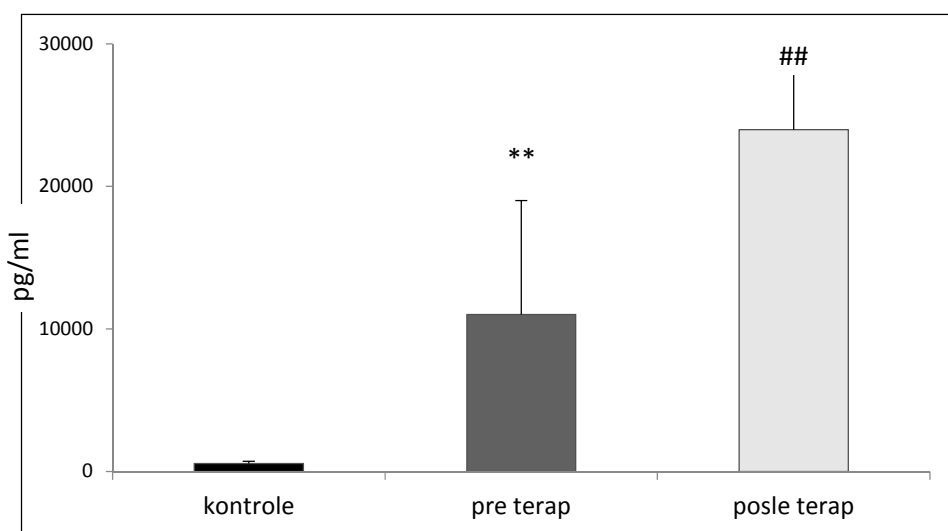
Grafik 22. Produkcija IL-10 u stimulisanim mononuklearnim celijama periferne krvi **bolesnika** u kulturi pre i nakon dvanaestonedeljne terapije alfakalcidolom. Vrednosti predstavljene kao srednja vrednost \pm SD; * $p<0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; ** $p<0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; # $p<0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfakalcidolom ($2\mu\text{g/dnevno}$); ## $p<0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfakalcidolom ($2\mu\text{g/dnevno}$).

Slično je bilo i sa produkcijom TGF- β . Naime, nakon terapije alfakalcidolom, došlo je do statistički značajnog porasta produkcije ovog citokina (1229.0 vs 1604.3 ± 1145.2 , $p=0.048$).



Grafik 23. Produkcija TGF- β u stimulisanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi **bolesnika** u kulturi pre i nakon dvanaestonedeljne terapije alfakalcidolom. Vrednosti predstavljene kao srednja vrednost \pm SD; * $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; ** $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; # $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfakalcidolom ($2\mu\text{g/dnevno}$) ; ## $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfakalcidolom ($2\mu\text{g/dnevno}$).

Produkcija IFN-g je u kontrolnoj grupi zdravih iznosila 559.4 ± 157.4 . U grupi bolesnika sa aktivnom bolešću ova produkcija je bila statistički značajno viša (11007.7 ± 14591.5 ; $p = 0.012$), dok je studijski tretman alfakalcidolom doveo do još statistički značajno veće stimulisane produkcije ovog citokina u kulturi u odnosu na vrednosti pre terapije (23975.9 ± 24963.2 , $p = 0.001$).



Grafik 24. Produkcija IFN- γ u stimulisanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi **kontrola i bolesnika** u kulturi pre i nakon dvanaestonedeljne terapije alfakalcidolom. Vrednosti predstavljene kao srednja vrednost \pm SD; * $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; ** $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju zdravih kontrola; # $p < 0.05$ u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfakalcidolom ($2\mu\text{g/dnevno}$) ; ## $p < 0.01$ u odnosu na stimulisanu produkciju pre terapije alfakalcidolom ($2\mu\text{g/dnevno}$).

5.5. KONCENTRACIJA CITOKINA U SERUMU BOLESNIKA SA RA PRE I POSLE TERAPIJE ALFAKALCIDOLOM

Vrednosti serumskih citokina određivane su kod svih ispitanika na početku studijskog protokola a rezultati su prikazani u tabeli 18.

Tabela 18. Koncentracije serumskih citokina bolesnika sa RA pre terapije alfa-kalcidolom

Citokin	n	Srednja vrednost ± SD (pg/ml)	Medijana (IQR)	Min-Max
IL 4	16	5,0 ± 2,8	3,9 (5,3)	1,7-10,2
IL 6	16	123,4 ± 238,4	38,5 (86,7)	11,2-955,5
IL 10	16	16,6 ± 41,0	4,1 (4,3)	1,8-167,5
IL 17	16	5,7 ± 2,1	5,3 (3,8)	3,1-9,2
IL 21	16	136,5 ± 311,9	51,8 (38,5)	22,2-1302,4
TNF α	16	3,5 ± 2,9	2,5 (2,4)	1,2-13,4
IFN γ	16	17,2 ± 9,6	13,1 (14,9)	4,3-37,3

SD, standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

Vrednosti serumskih citokina određivane su kod svih ispitanika nakon dvanaestonedeljnog tretmana alfa-kalcidolom (V12) a rezultati su prikazani u tabeli 19.

Tabela 19. Koncentracije serumskih citokina bolesnika sa RA nakon 12 nedelja uzimanja alfa-kalcidiola

Citokin	n	Srednja vrednost ± SD (pg/ml)	Medijana (IQR)	Min-Max
IL 4	16	5,8 ± 3,1	4,8 (4,9)	2,3-12,0
IL 6	16	75,4 ± 176,1	31,7 (30,1)	9,8-732,9
IL 10	16	30,0 ± 76,0	3,9 (6,2)	0,7-289,3
IL 17	16	15,7 ± 20,0	6,6 (13,2)	3,1-74,0
IL 21	16	133,3 ± 211,5	77,2 (60,1)	3,1-882,6
TNF α	16	3,7 ± 3,1	2,7 (1,6)	0,9-14,5
IFN γ	16	20,2 ± 15,2	17,5 (16,2)	3,8-62,6

SD, standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

Tabela 20. Koncentracije serumskih citokina bolesnika sa RA pre i nakon 12 nedelja terapije alfakalcidolom

Citokin	n*	Pre(pg/ml)	Posle(pg/ml)	Razlika**	P vrednost
IL 4	16/16	3,9 (5,3)	4,8 (4,9)	-0,8 ± 3,4	0,245
IL 6	16/16	38,5 (86,7)	31,7 (30,1)	47,9 ± 94,9	0,121
IL 10	16/16	4,1 (4,3)	3,9 (6,2)	-13,4 ± 38,2	0,569
IL 17	16/16	5,3 (3,8)	6,6 (13,2)	-10,0 ± 19,4	0,004
IL 21	16/16	51,8 (38,5)	77,2 (60,1)	3,2 ± 389,8	0,733
TNF α	16/16	2,5 (2,4)	2,7 (1,6)	-0,1 ± 1,6	0,761
IFN γ	16/16	13,1 (14,9)	17,5 (16,2)	-3,0 ± 11,7	0,845

*broj parova/broj pacijenata

**srednja vrednost ± SD razlika u odnosu na koncentraciju citokina pre terapije

Poređenjem vrednosti koncentracije serumskih citokina pacijenata pre i nakon studijskog protokola koji je podrazumevao dvanaestonedeljnu terapiju alfakalcidolom pokazano je da je jedino koncentracija IL-17 nakon tretmana alfakalcidolom bila statistički značajno viša u odnosu na početne vrednosti gde je vrednost sa 5.3±3.8 pg/ml porasla na 6.6±13.2 pg/ml (visoka statistička značajnost p=0,004). Koncentracija proinflamatornog citokina IL-6 je bila niža nakon tretmana alfakalcidolom u odnosu na koncentraciju ovog citokina pre terapije (31.7 vs 38.5 pg/ml) ali ova razlika nije bila statistički značajna. Takođe, nisu opažene ni značajne razlike u koncentraciji ostalih citokina u serumu pre i posle terapije alfakalcidolom.

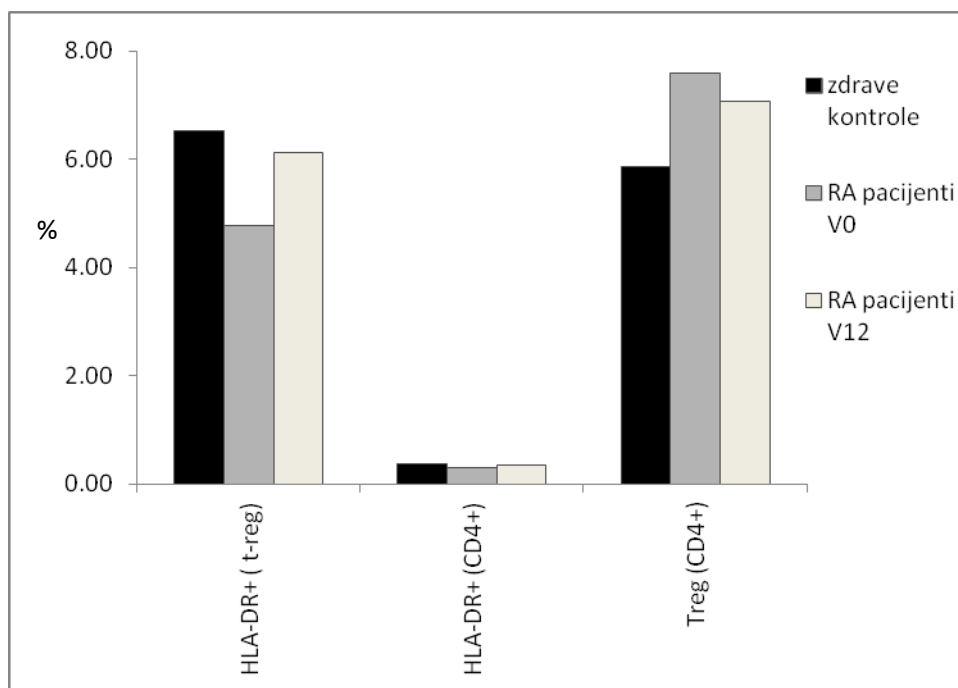
5.6. REGULATORNI T LIMFOCITI PERIFERNE KRVI BOLESNIKA SA RA PRE I POSLE TERAPIJE ALFAKALCIDOLOM

Analizom Treg limfocita u perifernoj krvi pacijenata sa aktivnim RA primećen je manji procenat aktiviranih Treg ćelija (HLA-DR+ u odnosu na ukupne T-reg limfocite) u odnosu na kontrolnu grupu zdravih što je blizu granice statističke značajnosti (4.76% vs 6.5%, $p=0.07$). Nasuprot tome, procenat ukupnih Treg ćelija (Treg u odnosu na ukupne CD4+) je bio nešto viši kod bolesnika u odnosu na grupu zdravih kontrola (7.6% vs. 5.85%, $p=0.129$). Nakon dvanaestonedelnog tretmana alfa-kalcidolom kod bolesnika sa RA došlo je do povećanja procenta aktiviranih Treg ćelija (HLA-DR+ u odnosu na ukupne T-reg limfocite) u odnosu na vrednosti detektovane na početku studije, i to do nivoa koji je zabeležen u grupi zdravih kontrola (6.13% vs 4.76%, $p=0.219$).

Tabela 21. Terapija alfa-kalcidolom dovodi do značajnog povećanja procenta aktiviranih Treg limfocita kod pacijenata sa aktivnim RA.

	HLA-DR+ (t-reg)	HLA-DR+ (CD4+)	Treg (CD4+)
zdrave kontrole	6.54	0.37	5.85
RA pacijenti V0	4.77	0.31	7.60
RA pacijenti V12	6.13	0.34	7.06

Procenat ukupnih i aktiviranih Treg limfocita određen je u kontrolnoj grupi, i grupi pacijenata pre i nakon dvanaestonedeljne terapije alfa-kalcidolom. HLA-DR+ (t-reg)- procenat aktiviranih Treg limfocita u odnosu na ukupne Treg limfocite; HLA-DR+(CD4+)- procenat aktiviranih Treg limfocita u odnosu na ukupne CD4+ limfocite; Treg (CD4+)- procenat ukupnih Treg limfocita u odnosu na ukupne CD4+ limfocite.



Grafik 25. Terapija alfacalcidolom dovodi do značajnog povećanja procenta aktiviranih Treg limfocita kod pacijenata sa aktivnim RA. Procentat ukupnih i aktiviranih Treg limfocita određen je u kontrolnoj grupi, i grupi pacijenata pre i nakon dvanaestonedeljne terapije alfacalcidolom. HLA-DR+ (t-regs)- procentat aktiviranih Treg limfocita u odnosu na ukupne Treg limfocite; HLA-DR+(CD4+)- procentat aktiviranih Treg limfocita u odnosu na ukupne CD4+ limfocite; Treg (CD4+)- procentat ukupnih Treg limfocita u odnosu na ukupne CD4+ limfocite.

5.7. PARAMETRI OKSIDATIVNOG STRESA PRE I POSLE TERAPIJE ALFAKALCIDOLOM

U cilju objašnjenja patofiziološkog mehanizma nastanka reumatoidnog artritisa kao i dejstva alfacalcidola na pojedine vrste ćelija u organizmu, pre započinjanja studijskog tretmana kao i po završetku, u lizatima opranih eritrocita bolesnika i kontrola određivana je aktivnost antioksidativnih enzima kao i koncentracija glutaciona, a koncentracija malondialdehida određivana je u serumu. Rezultati su prikazani u tabelama 16 i 17.

Parametri aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, CAT, GPx), nivo GSH u eritrocitima kao i koncentracija MDA u plazmi, pacijenata sa aktivnim RA pre (V0) i posle 12 nedelja (V12) tretmana alfacalcidolom, kao i kontrolne grupe (K) prikazani su u tabeli 16.

Tretman alfacalcidolom je značajno smanjio aktivnost SOD (V0/V12; $p = 0,04$) i CAT (V0/V12; $p = 0,001$) u eritrocitima RA pacijenata. Dok je aktivnost SOD

svedena na nivo vrednosti dobijenih u zdravoj kontrolnoj grupi, aktivnost CAT nakon tretmana alfakalcidolom je smanjena na nivo još znatno niži nego u kontrolnoj grupi ($p = 0,000$). Međutim, nije primećena značajna razlika u CAT aktivnosti u eritrocitima RA pacijenata pre terapije (V0) u odnosu na kontrolnu grupu (V0/K, $p = 0,37$). Aktivnost GPx je bila značajno niža u eritrocitima RA pacijenata pre tretmana (V0) u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0,04$). U skladu sa nižim vrednostima GPx, nivoi GSH su bili značajno veći u eritrocitima RA pacijenata na početku studije (V0) u poređenju sa kontrolnom grupom ($p = 0,03$).

Iako je dvanaestonedeljna terapija alfakalcidolom vratila aktivnost GPx u eritrocitima na nivo kontrolne grupe, nije postojala značajna razlika između vrednosti dobijenih pre i nakon terapijskog tretmanana (V0 vs V12, $p>0,05$). Sa druge strane, dvanaestonedeljna terapija alfackalcidolom dovela je do visoko statisticki značajnog smanjenja nivoa GSH ($p = 0,01$).

Pored nivoa glutaciona i aktivnosti antioksidativnih enzima, oksidativni stres je dodatno evaluiran merenjem nivoa malondialdehida (MDA), proizvoda peroksidacije lipida indukovane od strane ROS. U ovoj studiji, iako je pokazano da tretman alfakalcidolom smanjuje nivo MDA u grupi pacijenata, ta razlika nije postigla statističku značajnost (V0/V12, $p= 0,19$). Međutim, nivo MDA u grupi pacijenata na početku studijskog protokola (V0), bio je statisticki značajno povišen u odnosu na kontrolnu grupu (V0/Ctrl $p=0,01$), što ukazuje na prisustvo oksidativnog stresa kod bolesnika sa aktivnom bolešću.

Tabela 21. Aktivnost antioksidativnih enzima (SOD , CAT i GPx), nivo glutaciona (GSH) u eritrocitima i koncentracija MDA u plazmi pacijenata sa aktivnim RA pre i posle dvanaest nedelja terapije alfakalcidolom i kontrolne grupe.

	SOD (U / gHb)	CAT (U / gHb)	GPx (U / gHb)	GSH ($\mu\text{mol} / \text{gHb}$)	MDA (nmol/ml)
Kontrole	450 \pm 110	1300 \pm 600	5.2 \pm 1.8	4.7 \pm 1.2	106 \pm 57
RA pacijenti					
V0	510 \pm 100*	1500 \pm 800**	3.7 \pm 1.6 [#]	6.0 \pm 2.1*** [#]	163 \pm 30 ^{##}
V12	470 \pm 130	258 (302) ^{##}	3.9 (0.8)	3.7 \pm 1.2	149 \pm 42

SOD – superoksid dismutaza; CAT – katalaza; GPx – Glutation peroksidaza; GSH – glutation; MDA – malondialdehid; U – intencionalna jedinica enzimske aktivnosti; Hb – hemoglobin; RA – reumatoidni artritis; W0- pre terapije; W12- nakon 12 nedelja terapije; vrednosti predstavljene kao srednja vrednost

± sd ili Median (IQR); * p<0.05 u odnosu na W12; ** p<0.01 u odnosu na W12; # p<0.05 u odnosu na kontrolu; ## p<0.01 u odnosu na kontrolu.

Da bi se dobio dodatni uvid u efekat dvanaestonedeljne terapije alfakalcidolom, meren je intenzitet proizvodnje superoksidnog anjona (O_2^-) i potencijal mitohondrijalne membrane u stimulisanim PBMC kontrola i pacijenata (V0 i V12). Dobijeni rezultati su pokazali da stimulacija uzrokuje povećanje DHE intenziteta fluorescence u kontrolnoj PMBC sto ukazuje na O_2^- proizvodnju (Tabela 17). Osim toga, u PBMC pacijenata na početku studije (V0), proizvodnja superoksidnog anjona je bila veća u odnosu na zdrave kontrole, ali ta razlika nije dostigla statističku značajnost (V0/CTRL, p = 0.09). Takođe, FL1/FL2 odnos povećan je u stimulisanim kontrolama kao i kod bolesnika (V0), sugerišući sposobnost stimulacije da izazove depolarizaciju unutrašnje mitohondrijalne membrane (Tabela 17).

S druge strane, tretman alfakalcidolom promenio je odgovor PBMC pacijenata (V12) na stimulaciju, gde je pokazalno smanjenje proizvodnje superoksidnog anjona (V0/V12; p=0.10) i odsustvo depolarizacije unutrašnje mitohondrijalne membrane (V0/V12; p=0.001) sugerišuci zaštitni uticaj alfakalcidola na osetljivost PBMC na oksidativni stres indukovani PMA-jonomicin stimulacijom u in vitro uslovima.

Tabela 22. Proizvodnja superoksidnog anjona (O_2^-) i promene potencijala mitohondrijalne membrane u stimulisanim PBMC kontrola i bolesnika sa RA pre, i nakon dvanaest nedelja terapije alfakalcidolom

	DHE	JC1
Kontrole	1.7 ± 0.5	1.4 ± 0.2
RA pacijenti		
V0	2.2 ± 0.6	1.3 ± 0.2**
V12	1.5 ± 0.5	0.8 ± 0.2

DHE – dihidroethidium; JC1 – lipofilni katjon; PBMC – peripheral blood mononuclear cells mononuklearne celije periferne krvi); V0- pre terapije; V12- nakon 12 nedelja terapije; vrednosti prikazane kao srednja vrednost ± sd; * p<0.05 u odnosu na W12; ** p<0.01 u odnosu na W12; # p<0.05 u odnosu na kontrolu; ## p<0.01 u odnosu na kontrolu.

5.8. SERUMSKA KONCENTRACIJA VITAMINA D

Vrednosti serumskog 25(OH)D određivane su kod svih ispitanika na početku studijskog protokola (V0) i nakon dvanaestonedelnog tretmana alfakalcidolom (V12). Pre započinjanja studije srednja vrednost koncentracije vitamina D u serumu bolesnika sa RA iznosila je $29,9 \pm 10,1$ ng/ml a po završetku terapijskog protokola alfakalcidolom iznosila je $31,0 \pm 12,5$ ng/ml tj. nije bilo statistički značajne promene. (Tabela 21, Grafik). Time je pokazano da alfakalcidol nije doveo do značajne promene koncentracije 25(OH)D u krvi pacijenata sto je bilo i očekivano, obzirom na to da je 25(OH)D u metaboličkom putu vitamina D, prethodnik aktivnog hormona D (kalcitriola) čiji je sintetski analog alfakalcidol.

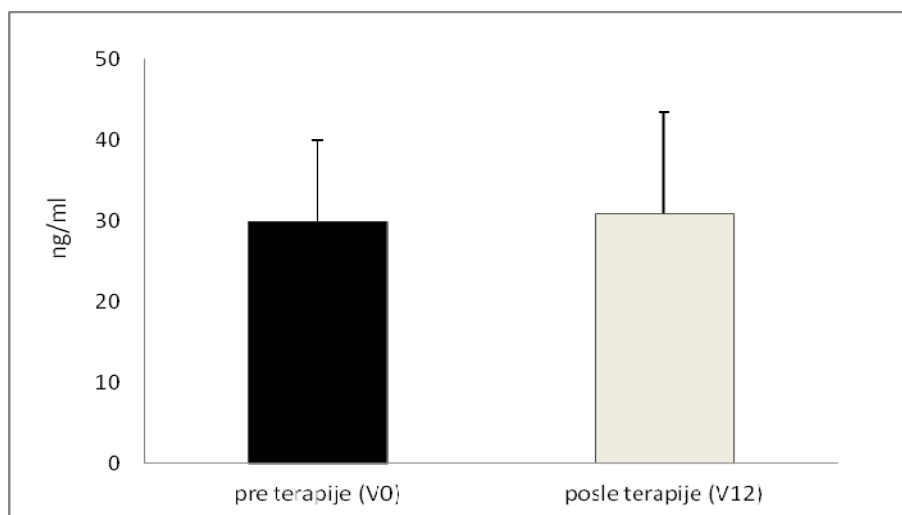
Tabela 23. Vitamin D pre i nakon 12 nedelja terapije alfakalcidolom

	n*	Pre	Posle	Razlika**	P vrednost
Vitamin D	16/16	$29,8 \pm 10,8$	$30,7 \pm 13,2$	-0,9	0,781

Vrednosti prikazane kao srednja vrednost \pm SD.

*Broj parova/broj pacijenata

**Srednja vrednost \pm SD razlika između V0 i V12.



Grafik 26. Koncentracija vitamina D u serumu pacijenata pre započinjanja studijskog tretmana i nakon dvanaestonedeljne terapije alfakalcidolom. Rezultati su izraženi u (ng/ml) a prikazani su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija

5.9. UTICAJ TERAPIJSKE PRIMENE ALFAKALCIDOLA NA PARAMETERE AKTIVNOSTI REUMATOIDNOG ARTRITISA

5.9.1. Markeri zapaljenja

Sedimentacija eritrocita u grupi bolesnika sa aktivnim reumatoidnim artritisom pre terapijske primene alfa-kalcidiola iznosila je $41,6 \pm 25,4$ mm. Po završenoj terapiji, doslo je do statistički značajnog pada sedimentacije na $31,4 \pm 17,7$ mm ($p < 0,05$ t-test i Mann-Whitney test).

Koncentracija **C-reaktivnog proteina** u grupi bolesnika sa aktivnim reumatoidnim artritisom pre terapijske primene alfa-kalcidiola iznosila je $31,9 \pm 28,5$ mg/l. Posle 12 nedelja terapije alfa-kalcidolom došlo je do statistički značajnog pada koncentracija C-reaktivnog proteina $11,0 \pm 12,1$ ($p = 0,018$).

Tabela 24. Parametri zapaljenja pacijenata pre uzimanja alfa-kalcidiola

Parametar	N	Srednja vrednost \pm SD	Medijana (IQR)	Min-Max
CRP	16	$31,9 \pm 28,5$	19,9 (39,8)	0,5-97,8
SE	16	$41,6 \pm 25,4$	32,5 (39,0)	5,0-90,0

SD, standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

Tabela 25. Parametri zapaljenja pacijenata nakon 12 nedelja uzimanja alfa-kalcidiola

Parametar	N	Srednja vrednost \pm SD	Medijana (IQR)	Min-Max
CRP	16	$11,0 \pm 12,1$	6,2 (19,3)	0,1-37,4
SE	16	$31,4 \pm 17,5$	30,0 (18,5)	5,0-80,0

SD, standardna devijacija; IQR, Interkvartilni opseg.

Tabela 26. Koncentracije parametara zapaljenja pacijenata pre i nakon 12 nedelja uzimanja alfa-kalcidiola

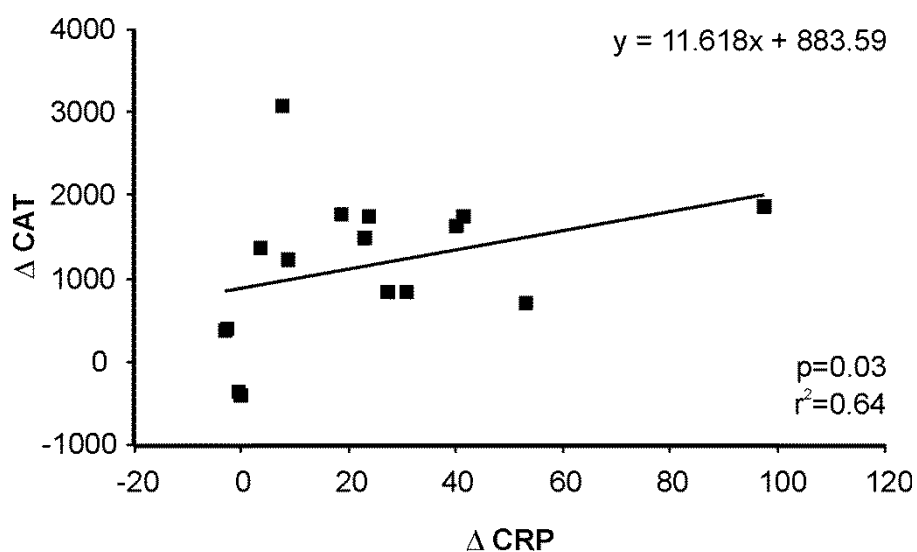
Parametar	n*	Pre	Posle	Razlika**	P vrednost
CRP	16/16	19,9 (39,8)	6,2 (19,3)	22,6	0,018
SE	16/16	32,5 (39,0)	30,0 (18,5)	10,2	0,009

Vrednosti prikazane kao medijana (interkvartilni opseg).

*Broj parova/broj pacijenata

**Srednja vrednost \pm SD razlika između V0 i V12

Primećena je značajna pozitivna korelacija ($r^2 = 0,64$, $p = 0,02$) između promene aktivnosti CAT (Δ CAT) i promene nivoa CRP (Δ CRP), (Grafik 2).



Grafik 27. Korelacija između promene u CAT aktivnosti (Δ CAT) i nivoa CRP (Δ CRP) kod blesnika sa RA tretiranih alfacalcidolom

5.9.2. Indeks aktivnosti reumatoidnog artritisa (DAS 28 (SE))

Indeks aktivnosti RA DAS 28 iznosio je na početku studije 5.8 ± 0.9 , da bi nakon sprovedenog terapijskog protokola došlo do statistički značajnog sniženja vrednosti ovog indeksa na 4.3 ± 1.0 ($p < 0,0001$).

Tabela 27. Aktivnost bolesti pre i nakon 12 nedelja terapije alfacalcidolom

	n*	Pre (V0)	Posle (V12)	Razlika**	P vrednost
DAS				1,5	
28	16/16	$5,8 \pm 0,9$	$4,3 \pm 1,0$		< 0,0001

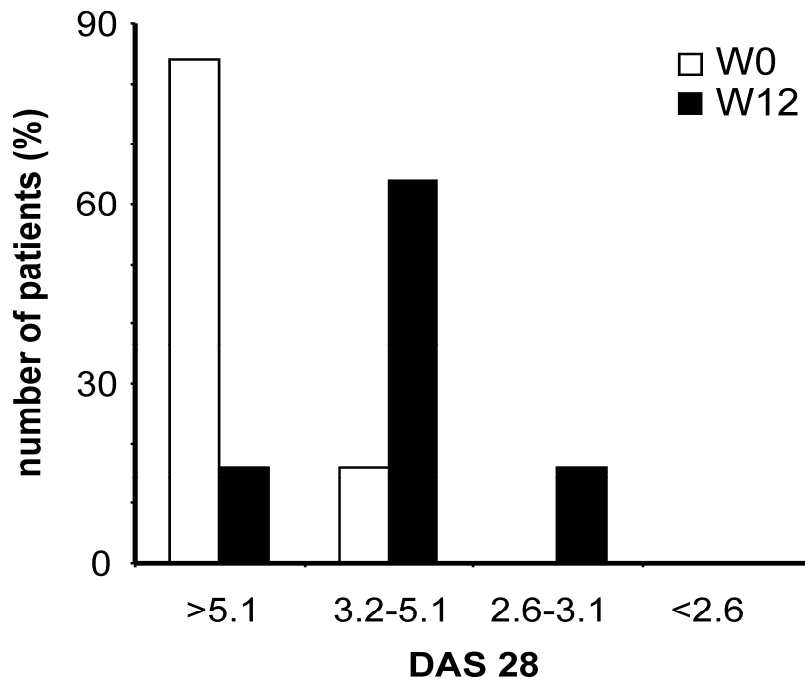
Vrednosti prikazane kao srednja vrednost \pm SD.

*Broj parova/broj pacijenata

**Srednja vrednost \pm SD razlika između V0 i V12

Takođe, značajno se promenila i distribucija pacijenata prema nivou aktivnosti bolesti. Na početku studije (V0), najveći broj pacijenata (84 %) je bio u grupi visoke aktivnosti bolesti (DAS 28 > 5.1) dok je 16 % pacijenata bilo u grupi umerene aktivnosti bolesti ($3.2 < \text{DAS } 28 < 5.1$). Nije bilo pacijenata sa niskom aktivnošću bolesti (DAS 28 < 3.2). Posle tretmana (V12), samo 16 % pacijenata je ostalo u grupi

visoko aktivne bolesti, njih 68% je imalo umerenu aktivnosti bolesti, a 16% pacijenata je imalo nisku aktivnosti bolesti (DAS 28 < 3.2) (Grafik).



Grafik 28. Uticaj terapije alfakalcidolom na stepen aktivnosti RA

6. DISKUSIJA

Reumatoidni artritis je hronična zapaljenska bolest koja predominantno zahvata zglobove. Brojni citokini su funkcionalno aktivni u sinovijalnom tkivu i uključeni su u patogenezu ove bolesti. Smatra se da je TNF-alfa glavni citokin u patogenezi RA. Poslednjih godina, terapija koja blokira TNF-alfa je deo standardnog tretmana bolesnika sa reumatoidnim artritismom i dovodi do pozitivnog kliničkog odgovora kod većine bolesnika sa RA (Gartlehner i sar, 2006). Pored toga, inhibicija produkcije TNF-a sprečava periartikularni i generalizovani gubitak koštanog tkiva kod obolelih (Marotte i sar, 2007). Za kalcitriol je od ranije poznato da inhibira produkciju TNF-alfa u mononuklearnim ćelijama koje su stimulisane ili sa IFN-gama ili forbolskim estrima ali da nema uticaja na produkciju IL1-alfa i IL1-beta (Brennan i McInnes, 2008). Nedavno je pokazano i da kalcitriol *in vitro* inhibira ne samo produkciju TNF-alfa već i nivo RANKL što ukazuje i da može delovati na smanjenje oštećenja hrskavice i kostiju kod obolelih od RA (Zhang i sar, 2013). Interesantno je da nije pokazan efekat $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na proizvodnju TNF-a od strane CD4^+ T ćelija kod pacijenata obolelih od Kronove bolesti (Bartels i sar 2007). U studiji De Antonia i sar (2002) pokazano je da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ može i da stimuliše i da inhibira produkciju TNF-a zavisno od toga na koju podgrupu T ćelija deluje. U *in vitro* eksperimentima u našoj studiji korišćene su sve mononuklearne ćelije periferne krvi što omogućava procenu zbirnog imunomodulatornog efekta alfakalcidola. Prva studija koja je pokazala da i alfakalcidol ima imunomodularni efekat u RA objavljena je 1999.god (Andjelkovic i sar, 1999). U podgrupi bolesnika sa visoko aktivnim RA i povećanom proliferacijom limfocita indukovanom mitogenom, *in vitro* dodat alfakalcidol, značajno je smanjio kapacitet proliferacije limfocita. Rezultati naše studije, pokazali su da alfakalcidol *in vitro* značajno smanjuje produkciju TNF-alfa u kulturi monuklearnih ćelija periferne krvi kontrola. Veći stepen smanjenja produkcije ovog citokina dobijen je kod bolesnika sa aktivnim RA, kod kojih je produkcije TNF-alfa smanjena za više od 10 puta u odnosu na vrednost pre tretmana alfakalcidolom. Ostvareni efekti alfakalcidola na produkciju TNF-alfa nisu se značajno razlikovali od efekata kalcitriola koga smo primenjivali pod istim eksperimentalnim uslovima.

I interleukin 17 je proinflamatorni citokin koji je uključen u patogenezu mnogih autoimunskih bolesti uključujući reumatoidni artritis, psorijazu i multiplu sklerozu

(Roeleveld i Koendres, 2015) Prepoznavanje važnosti IL-23/IL-17 puta u različitim modelima autoimunosti dovelo je do otkrića Th17 ćelija (Harrington i sar, 2005). Ove ćelije su subset T ćelija, koje osim IL-17 sekretuju brojne druge citokine kao što su IL-21, IL-22 i faktor nekroze tumora. Diferencijacija naivnih T ćelija u Th17 ćelije je regulisana kombinacijom TGF-beta, koji je takođe neophodan za razvoj anti-inflamatornih T ćelija, i najmanje jednog od sledećih citokina IL-6, IL-21, IL-1b i IL-23 (Manel N i sar, 2008). IL-17 uglavnom produkuje CD4 + Th17 ćelije, ali ga takođe mogu stvarati CD8 + T ćelije, NK T ćelije, neutrofil i ćelije limfnog tkiva. IL-17 povećava proizvodnju matriks metaloproteinaza (MMP) 1 i 3, kao i nekih pro-inflamatornih citokina kao što TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-8 (Agarwal i sar, 2008). Takođe povećava oštećenje kosti uzrokujući povećanje sekrecije iNOS od strane RANK i M-CSF stimuliranih osteoklasta (Adamopoulos i sar, 2010). Ovaj citokin stimuliše proizvodnju određenih hemokina kao što su C-X-C hemokin 5 i C-X-C hemokin 12 i na taj način povećava infiltraciju imunskih ćelija u sinovijum (Kim i sar, 2007). Osim toga, dovodi do neovaskularizacije promovisanjem rasta krvnih sudova i migracije endotelnih ćelija i VEGF u sinovijum procesom hemotakse (Honorati i sar, 2006). Povećan nivo IL-17 je pronađen u serumu i sinovijalnoj tečnosti bolesnika sa RA (Sarah LG, 2010). Neutralizacija IL-17 bilo sa rastvorljivim IL-17R ili sa anti-inflamatornim agensima dovodi do poboljšanja u artritisu (Sarah LG, 2010). Inhibicijom IL-17 dolazi do smanjenja zapaljenja i razaranja kosti u animalnim modelima artritisa (Koenders i sar, 2005; Sarkar i sar, 2009). U studiji Colin i sar (2010) pokazano je da suplementacija sa 1,25(OH)2D3 u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa ranim artritisom, inhibira, u dozno-zavisnom režimu, produkciju IL-17. Naši rezultati su bili u skladu sa ovim nalazom, jer je pokazano veoma značajno inhibitorno dejstvo alfa-kalcidola *in vitro* i u kulturi PMBC zdravih i u kulturi PMBC bolesnika sa aktivnim RA na produkciju IL-17. U poređenju sa alfa-kalcidolom, kalcitriol je u istim eksperimentalnim uslovima u većoj meri suprimirao produkciju IL-17 u PMBC obolelih, dok nije bilo razlike kod zdravih. Takođe u kineskoj studiji iz 2015. godine (Xiaoying, 2015) pokazano je da 1,25(OH)2D3 suprimira produkciju citokina Th17 tipa u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa ranim RA. Za razliku od našeg istraživanja u ovoj studiji ćelije su bile stimulirane sa anti-CD3/anti-CD28 antitelima.

Interleukin - 21 je deo Th-17 citokinskog profila ali ga mogu proizvoditi i Th1 , Th2 i NK ćelije (Ettinger i sar, 2008). Po svojoj strukturi sličan je IL-2 , IL- 4 i IL-15. Receptor za IL- 21 (IL21R) ima konzerviran ekstracelularni citokin-vezujući region. Vezivanje IL - 21 sa svojim receptorom dovodi do dimerizacije receptora sa zajedničkim gama lancem koji zauzvrat posreduje u prenosu signala preko JAK3 i STAT5 signalnog puta (Richard i Shiva, 2013). Ovaj interleukin je detektovan u sinovijalnom tkivu i serumu bolesnika sa RA u koncentracijama koje su znatno više nego u sinovijalnom tkivu i serumu bolesnika sa osteoartritisom (Niu i sar, 2010). Utvrđeno je da promoviše infiltraciju ćelija u sinovijalnom tkivu i time doprinosi strukturnom oštećenju zglobova. Naši rezultati su pokazali da je in vitro tretman alfa-kalcidolom kulture PBMC zdravih doveo do visoko statistički značajnog smanjenja produkcije IL-21. Isti efekat pokazan je i u kulturi PMBC bolesnika sa aktivnim RA gde je in vitro tretman alfa-kalcidolom doveo do visoko statistički značajnog smanjenja produkcije IL-21. Rezultati su u skladu sa prethodno navedenim nalazima za IL-17 što je očekivano imajući u vidu da su ova dva citokina deo istog citokinskog puta. In vitro tretman kalcitriolom imao je takođe inhibitorski efekat na produkciju IL-21 u kulturama i u odnosu na tretman alfa-kalcidolom ova inhibicija je bila snažnija.

Interleukin-6 je 22-29 KD glikoprotein. Proizvode ga različite ćelije kao što su B ćelije, T ćelije, fibroblasti, endotelijalne ćelije, monociti, makrofagi, keratinociti, hondrociti i neke tumorske ćelije. IL- 6 receptor (IL6-R) ima dva lanca , IL-6-specifični receptor (IL - 6RA) i gp130 signalni protein. Obe subjediniče postoje i u solubilnoj formi. U klasičnom signalnom putu, IL- 6 se vezuje za transmembranski IL-6R i nakon toga ovaj kompleks se udružuje sa signalnim molekulom, gp130, koji indukuje aktivaciju signalnih događaja u ciljnim ćelijama preko proteina Janus kinaze. Transmembranski IL - 6R je eksprimiran na samo nekim ćelijama poput hepatocita i nekih leukocita, dok je gp130 eksprimiran na svim ćelijama (Stefan i sar, 2012). Trans-signalni put se aktivira preko solubilne forme IL-6R koja nema transmembranski i citoplazmatski region i vezuje se za membransku gp130 subjedinicu. Visok nivo IL- 6 je pronađen u krvi i sinovijalnoj tečnosti bolesnika sa RA. IL-6 izaziva inflamaciju i razaranje zglobova delujući na neutrofile koji stvaraju reaktivna kiseonična jedinjenja i proteolitičke enzime (Dayer i Choy, 2010). Pospešuje diferencijaciju osteoklasta preko receptora aktivatora NF - kappa B

zavisnih liganda (RANKL) ili preko RANKL nezavisnih mehanizama (Yuji i Toshio, 2014). On takođe pokazuje sinergizam sa IL - 1b i TNF-a u proizvodnji vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF), koji je ključni citokin u stvaranju i održavanje panusa koji predstavlja zapaljensko vaskularno tkivo u zglobovima (Dayer i Choy, 2010). Neki od laboratorijskih nalaza kod bolesnika sa RA kao što su povećan nivo C - reaktivnog proteina (CRP), hipoalbuminemija i hiperkoagulabilnost posredovani su IL - 6. Pokazano je da je povećanje nivoa IL - 6 povezano sa povećanom verovatnoćom nastanka infarkta miokarda (Yuji i Toshio, 2014). U našem istraživanju pokazali smo da nakon *in vitro* tretmana alfa-kalcidolom kao i kalcitriolom u kulturi PBMC bolesnika sa aktivnim RA, dolazi do smanjenja produkcije ovog citokina, ali za razliku od efekata drugih proinflamacijskih citokina koje smo ispitali (TNF-alfa, IL-17 i IL-21) postignuto smanjenje nije bilo značajno. Interesantno je da iako se IL-6 u najvećoj meri smatra proinformativnim citokinom ovaj citokin ima i mnoga regenerativna i anti-inflamatorna svojstva. Smatra se da trans-signalni tip aktivacije IL-6R ima proinflamacijski efekat dok se anti-inflamacijska dejstva ostvaruju klasičnom signalizacijom (Scheller J, 2011).

Citokin čija uloga u patogenezi RA je još uvek kontroverzna je interferon gama (Lin i Young, 2013). Ovaj citokin pripada Th1 proinformativnom citokinskom profilu. Međutim, IFN-gama nije prisutan ili se detektuje u vrlo niskom nivou u sinovijalnoj membrani obolelih od RA i retko se detektuje u sinovijalnoj tečnosti (Mc Innes, 2007). Na životinjskom modelu artritisa indukovano kolagenom pokazano je da davanje IFN-gama ublažava bolest. Utvrđeno je i da IFN-gama inhibira produkciju MMP indukovanu interleukinom 1 beta u kulturi sinovijalnih fibroblasta obolelih od RA kao i da ispoljava snažnu negativnu regulatornu funkciju na privlačenje neutrofila u artritisu (Page i sar, 2010; Alvaro Gracia i sar, 1990) su pokazali da u kulturi sinoviocita koji su slični fibroblastima postoji antagonizam između TNF-alfa i IFN-gama. TNF-alfa je inhibirao HLA-DR ekspresiju indukovanu IFN-gama a sa druge strane IFN-gama je inhibirao efekte TNF-alfa u kulturi - proliferaciju sinoviocita i produkciju koagenaze i GM-CSF. I u našem istraživanju primećeno je da je primena alfa-kalcidola *in vitro* imala različit efekat na produkciju IFN-gama u odnosu na TNF-alfa. Naime ovaj tretman je doveo do povećanja produkcije IFN- γ u kulturi PBMC zdravih i bolesnika sa RA, za razliku od opaženog veoma značajnog smanjenja produkcije TNF-a u istim eksperimentalnim uslovima. Kalcitriol primenjen *in vitro* je

takodje imao stimulatorni efekat na produkciju IFN- γ i u kulturi PMBC zdravih kontrola i bolesnika sa RA. Za razliku od našeg istraživanja u studiji Jirapongsananuruk i sar, (2000) pokazano je da 1,25(OH)2D3 ima inhibitorni efekat na produkciju IFN-gama u kulturi PBMC zdravih, međutim u ovoj studiji su za stimulaciju PMBC korišćena anti-CD3 antitela koja deluju samo na zrele T ćelije.

Naše istraživanje je obuhvatilo i ispitivanje citokina Th2 tipa koji se u osnovi smatraju anti-inflamatornim (IL-4 i IL-10). U animalnom modelu artritisa indukovanog kolagenom, pokazano je da povećana ekspresija IL - 4 lokalno sprečava nastanak erozije kosti i hrskavice. Analiza koštanog tkiva pacijenata sa artritismom pokazala je konzistentnu supresiju tipa I kolagena, a da pod dejstvom IL - 4 dolazi do poboljšanja sinteze prokolagena tipa I, što sugerise ulogu IL- 4 u oporavku tkiva (Lubberts i sar, 2000). Kod pacijenata sa ranim RA, proizvodnja IL - 4 u sinovijalnim membranama je veća u poređenju sa zdravim kontrolama (Raza i sar, 2005). U studiji Collin i sar (2010) pokazano je da je produkcija IL-4 od strane PBMC pacijenata sa ranim artritismom bila gotovo upola manja od produkcije u zdravim kontrolama. Prisustvo 1,25(OH)2D3, je povećalo, na dozno zavisni način, produkciju IL-4 u grupi pacijenata sa ranim artritismom, te je produkcija IL-4 gotovo dostigla vrednosti dobijene kod zdravih. I u našoj studiji, *in vitro* tretman alfakalcidolom je u kulturi PBMC zdravih doveo je do značajnog povećanja produkcije IL-4. Isti efekat dobijen je i u kulturi PBMC bolesnika sa aktivnim RA. In vitro tretman kalcitriolom imao je isti efekat u kulturi PMBC bolesnika sa aktivnim RA, dok je porast produkcije IL-4 u PBMC zdravih bio značajno viši ne samo u odnosu na vrednost pre tretmana već i u odnosu na tretman alfakalcidolom.

Interleukin-10 je antiinflamatorni citokin koga produkuju monociti, makrofagi i T- i B- limfociti. Ovaj citokin smanjuje sintezu proinflamatornih citokina kao što su TNFa, IL-1a , IL-1b , IL- 6, IL- 8 , IL-12 i GM - CSF (Pia i Juha, 1997) . Osim toga, inhibira ekspresiju HLA - DR i B7 molekula što posledično sprečava prezentaciju antigena od strane makrofaga sinovijske tecnosti i periferne krvi bolesnika sa RA. (Mottonen i sar, 1998). Pokazano je i da inhibira produkciju MMP i stimuliše stvaranje tkivnog inhibitora metaloproteinaze - 1 (TIMP-1) od strane monocita. Interleukin-10 može i da inhibira proizvodnju prostaglandina E2 indukovanu sa TNF-alfa u kulturi sinovijalnih fibroblasta (Joel i sar, 2001).

Na mišijem modelu artritisa indukovanog kolagenom pokazano je da ubrizgavanje IL-10 suprimira bolest (Joel i sar, 2001). Pozitivni efekti IL-10 ogledaju se u smanjenju produkcije IgG2a, IL-1b, IL-2 i inhibiciji aktivnosti limfocita specifičnih za koagen (Apparailly i sar, 1998). U našoj studiji, pokazali smo da je *in vitro* tretman alfakalcidolom u kulturi PBMC bolesnika sa aktivnim RA doveo do blagog povećanja produkcije IL-10. *In vitro* tretman kalcitriolom doveo je do izraženijeg statistički značajnog povećanja nivoa produkcije IL-10 u kulturi PBMC bolesnika sa aktivnim RA. I Heine i saradnici (Heine i sar, 2008) su pokazali da kalcitriol promovise produkciju IL-10 ali na modelu B ćelija zdravih stimulisanih kao i u našoj studiji PMA i jonomicinom.

Transformišući faktor rasta (TGF)-beta je zajednički naziv za familiju molekula koji ispoljavaju i proinflamatorni i anti-inflamatorni efekat na imunski odgovor. Do sada su identifikovana tri člana ove familije TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3. Iako i TGF- β 1 i TGF- β 3 imaju imunoregulatorne funkcije smatra se da balans između profibrotičnog TGF- β 1 i anti-fibrotičnog TGF- β 3 određuju sudbinu funkcije organa posle inflamacije (Fujio, 2016, in press). Efekti TGF- β u autoimunskim inflamatornim bolestima su kompleksni i teško predvidivi, što ograničava kliničku primenu njegovih inhibitora (Smolen i sar, 2007; Sebastien i sar, 2013). Pokazano je da se genetski nedostatak TGF- β 1, najpotentnije TGF- β izoforme, dovodi do teške multi-organske inflamacije i autoimunosti (Arvikar i sar, 2013). Uloga TGF- u RA patogenezi ostaje kontroverzna, i postoje različiti podaci iz *in vitro* eksperimenata sa humanim reumatoidnim sinovijalnim ćelijama (Firestein, 2009; Wan i Flavell, 2008). TGF- β eksprimira većina ćelijskih komponenata u sinoviji bolesnika sa RA, pretežno makrofagi i T limfociti (Stockinger i Veldhoen, 2007; Firestein, 2009). U animalnom modelu artritisa, intraperitonealno davanje TGF- β 1 može sprečiti ili ublažiti simptome artritisa (Bettelli i sar, 2006). Takodje ubrizgavanje TGF- β 1 štiti od razvoja artritisa u animalnom modelu artritisa (Zhou i sar, 2008). Međutim, intraartikularna primena TGF- β 1 izaziva upale i oštećenja zglobova kod zdravih pacova (Vasanthi i sar, 2007).

Nekoliko studija je pokazalo prisustvo TGF- β 1 u sinovijalnom tkivu i sinovijalnoj tečnosti bolesnika sa RA (Finnegan i sar, 1999) i veću ekspresiju TGF- receptora tipa II (TGF- β RII) u sinovijalnim fibroblastima u reumatoidnom artritisu odnosu na osteoarthritis (Joosten i sar, 1997).

Naši rezultati su pokazali da je *in vitro* tretman alfakalcidolom je u kulturi PBMC bolesnika sa aktivnim RA doveo do značajnog povećanja produkcije TGF- β . Isti ali ne tako ubedljiv efekat ostvario je i *in vitro* tretman kalcitriolom.

Za *in vitro* tretmana PBMC zdravih i kontrola osim alfakalcidola i kalcitriola koristili smo i metilprednizolon sam ili zajedno sa alfakalcidolom. Kortikosteroidi u malim dozama se primenjuju u RA zbog njihovog antiinflamatornog dejstva. Inhibicija inflamacije može da spreči progresiju oštećenja kostiju i hrskavice u RA ali ne u potpunosti. U našem istraživanju je pokazano da metilprednizolon u kulturi PBMC bolesnika sa aktivnim RA ima inhibitorski efekat na produkciju citokina Th1 tipa (TNF- α i IL-6), Th17 tipa (IL-17) i ne ispoljava stimulatorski efekat na produkciju Th2 tipa citokina (IL-4 i IL-10), što je u skladu sa nalazima studije Collin i sar. (2010). Međutim, u kulturi PBMC zdravih tretiranih metilprednizolonom nije opažen pad produkcije Th17 tipa citokina, posebno IL-17. Moguće je da tip stimulacije koji smo koristili (PMA+jonomicin) pospešuje skretanje Th1 u Th17 kod zdravih i znatno povećava produkciju Th17 tipa citokina. U eksperimentalnoj studiji Miljković i sar (J of Neuroinflammation) opaženo je da je u ćelijama kičmene moždine pacova stimulisanim PMA+ jonomicin i tretiranim metilprednizolonom proporcija IFN-gama produkujućih ćelija je bila redukovana ali ne i IL-17 produkujućih ćelija.

Od posebnog značaja su i naši rezultati zajedničkog dejstva alfakalcidola i metilprednizolona na produkciju citokina. Pokazali smo da postoji sinergističko dejstvo alfakalcidola i metilprednizolona na produkciju proinflamatornih citokina, posebno TNF-alfa i IL-17 u kulturi PBMC bolesnika sa aktivnim RA. Slični rezultati prikazani su u studiji Collina i sar. koji su pokazali da 1,25(OH)2D3 ima povoljan efekat na Th1/Th17 i Th2 profil PBMC bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom visokog stepena aktivnosti i potencira efekte deksametazona na produkciju Th1/Th17 citokina. Autori smatraju da 1,25(OH)2D3 i njegovi analozi mogu da potenciraju inhibitorski efekat deksametazona na aktivnost osteoklasta i da na taj način mogu da imaju dodatnu ulogu kada se kombinuju sa kortikosteroidima u prevenciji fokalnih koštanih erozija u RA. Takođe, ističu da primena 1,25(OH)2D3 može da se razmotri i u prevenciji Th1 a specijalno Th2 polarizacije u veoma ranom stadijumu RA što bi moglo da dovede do usporavanja ili sprečavanja dalje progresije bolesti. Takođe, Studija Jirapongsananuruk i sar. (2000) je pokazala da kombinacija 1,25-OH₂D₃ sa kortikosteroidima značajno povećava imunosupresivni efekat kortikosteroida u Th1-

posredovanom odgovoru i stoga može da omogući štedljivu upotrebu kortikosteroida u lečenju autoimunskih bolesti ili sprečavanju odbacivanja grafta nakon transplantacije. Pokazano je da nema aditivnog imunosupresivnog efekta 1,25-OH₂D₃ i kortikosteroida na Th2 proizvodnju citokina već da ovaj hormon stimuliše produkciju Th2 citokina i inhibira steroidima posredovanu supresiju ovih citokina, što je u skladu sa rezultatima naše studije. U našem istraživanju opazili smo i veće povećanje produkcije anti-inflamatornog citokina, interleukina-10 kada je primenjen kombinovani tretman. U skladu sa ovim nalazom su rezultati Baretta i sar (2002) koji su pokazali da kombinacija deksametazona i vitamina D3 indukuje diferencijaciju mišijih i humanih naivnih CD4+T ćelija u regulatorne T ćelije koje proizvode samo IL-10. Kombinovana terapija kortikosteroida i analoga vitamina D se već koristi za lokalni tretman psorijaze (2014). U studiji Hidalgo i sar. 2010, pokazano je da kalcitriol u kombinaciji sa glukokortikoidom deksametazonom povećava nivo vitamin D receptora (VDR) i vezivanje liganda u ćelijama skvamocelularnog karcinoma. Interesantno je i da ukoliko se u kulturu osteoblasta koja je suplementisana metotreksatom doda 1,25-OH₂D₃ (Journal of Bone and Mineral Research 2009) dodatno se povećava inhibicioni efekat metotreksata na proliferaciju osteoblasta.

Studija Ikuo i sar. (2006) pokazala je da vitamin D analogi inhibiraju diferencijaciju dendritičkih ćelija kostne srži, Tc1 i Th1 ćelija, koje igraju najznačajniju ulogu u imunskom odgovoru tipa 1. Rezultati naših *in vitro* ispitivanja su pokazali da alfakalcidol, kao sintetski analog kalcitriola, može imati važnu ulogu u lečenju RA jer ispoljava efekte koji se ogledaju u modulaciji imunskog odgovora na nivou Th1/Th17 i Th2 citokinske ravnoteže. U skladu s tim naše istraživanje je obuhvatilo i ispitivanje efekata dvanaestonedeljne primene 2mcg alfakalcidolom kod bolesnika sa aktivnim RA na produkciju citokina *in vitro* i *in vivo*, profil regulatornih T ćelija, parametre oksidativnog stresa i zapaljenja. Tokom prethodnih decenija još nekoliko studija je potvrdilo terapijski potencijal alfakalcidola u hroničnim artritisa (Yamauchi 1989; Anđelković i sar, 1999; Gaal J i sar 2009). Rezultati studije iz Srbije (Anđelković i sar, 1999), pokazali su da je kod bolesnika sa RA, na bazičnoj terapiji, terapija alfakalcidolom u dozi od 2µg/dan alfakalcidola tokom tri meseca, dovela do značajnog kliničkog poboljšanja koje je bilo u jakoj korelaciji sa *in vitro* imunomodulatornim efektima.

U našoj studiji je pokazano da je produkcija proinflamatornih citokina Th1/Th17 tipa (TNF- α , IL-6, IL-17) u kulturi stimulisanih PBMC posle 12 nedelja terapije al fakalcidolom bila značajno niža u odnosu na vrednosti pre terapije. Opaženo je i značajno povećanje produkcije anti-inflamatornih citokina IL-10, TGF- β i IFN- γ . I u studiji Zold i sar (2011) primenjivana je terapija al fakalcidolom ali kod bolesnika sa nediferentovanom bolešću vezivnog tkiva i to u dozama 0.5 μ g, 1.0 μ g i 1.5 μ g dnevno tokom 5 nedelja. Pokazano je da terapija sa 1.0 μ g al fakalcidola dnevno inhibira i Th1 i Th 17 ćelije i preusmerava imunski odgovor u pravcu predominacije regulatornog citokina IL-10 što je u skladu sa našim rezultatima. Za razliku od nalaza (Zold i sar.) koji su pokazali da terapija al fakalcidolom dovodi do značajnog sniženja IL-17, IL-6, IL-23 i IFN-gama i povećanja IL-10 u našoj studiji nije bilo značajne promene u nivou serumskih citokina posle terapije, čak je primećen i porast IL-17. Ovo je najverovatnije posledica različitog cirkadijalnog ritma produkcije citokina kod ispitivanih bolesnika (Zhou K, 2010), što nije od značaja kada se ispituje stimulisana produkcija u kulturi PBMC. Napominjemo i da je u studiji Zold i sar. broj bolenika po grupama bio mali (sedam).

U nekoliko studija na animalnim modelima, pokazano je da regulatorne T ćelije (T reg) imaju predominantno proinflamatornu ulogu u patofizioloskim procesima nekih oboljenja, dok rezultati drugih studija dokazuju njihovu ulogu u inflamatornim procesima u zglobovima. Uzevši sve u obzir, smatra se da zapravo funkcionalna blokada Treg ćelija igra najvažniju ulogu u imunopatogenezi RA, najverovatnije zbog inhibicije njihove funkcije proinflamatornim citokinima, zbog povećanja broja aktiviranih efektorskih T celija ili možda zbog činjenice da neke potpuno diferentovane T reg celije mogu biti veoma nestabilne (Bayry i sar, 2007; Han i sar, 2008; Van Amelsfort i sar, 2007). Zaiss i sar u svojoj studiji su pokazali da povećanje aktivnosti i broja Treg celija ima veoma dobre efekte u lečenju inflamacijom-indukovanog gubitka koštane mase kod bolesnika sa RA, kao i u poboljšanju kliničkih znakova artritisa. Takođe, rezultati nekoliko studija u kojima je dokazana mogućnost Treg celija da suprimiraju inflamatorni odgovor kako u bolesnika tako i u animalnim modelima artritisa, učinili su ih interesantnim u lečenju RA. Analizom Treg limfocita u perifernoj krvi bolesnika sa aktivnim RA koji su bili uključeni u nas istraživački protokol, primećen je manji procenat aktiviranih Treg ćelija (HLA-DR+ u odnosu na ukupne T-reg limfocite) u odnosu na kontrolnu grupu

zdravih. Nasuprot tome, procenat ukupnih Treg ćelija (Treg u odnosu na ukupne CD4+) je bio nešto viši kod bolesnika u odnosu na grupu zdravih kontrola. Nakon dvanaestonedelnog tretmana alfakalcidolom, u grupi bolesnika sa RA došlo je do povećanja procenta aktiviranih Treg ćelija (HLA-DR+ u odnosu na ukupne T-reg limfocite) u odnosu na vrednosti detektovane na početku studije, i to do nivoa koji je zabeležen u grupi zdravih kontrola.

Slično našim rezultatima, analiza T reg u perifernoj krvi netretiranih HIVom inficiranih pacijenata otkrila je povećanje učestalosti T reg (T reg prema ukupnim CD4 T ćelije) pri čemu se njihov apsolutni broj (Treg po mikrolitru krvi) nije razlikovao od zdravih kontrola. Ali za razliku od dejstva terapije alfakalcidolom u našoj studiji, kod tretiranih HIV - inficiranih pacijenata, apsolutni broj kao i učestalost T reg ćelija su bili nizi u odnosu na vrednosti pre tretmana, i nisu bili značajno različiti od onih nađenih u zdravih kontrola (Epple i sar, 2006). Poznato je da TGF- β igra ključnu ulogu u diferencijaciji i funkciji regulatornih T ćelija (Treg) u mišijem modelu indukujući ekspresiju FoxP3 in vivo i in vitro (Kerstin i Steffen, 2015). Signalizacija preko TGF- β štiti T reg ćelija od apoptoze (Petrovic-Rackov, N. Pejnovic, 2006). Pokazano je da T reg ćelije imaju zaštitnu ulogu u artritisu indukovanom kolagenom (En-Yin i sar, 2015). U našem istraživanju je opaženo da posle suplementacije in vitro i dvanaestnedeljne terapije alfakalcidolom dolazi do značajnog povećanja produkcije TGF-beta citokina što je moglo da doprinese povećanju aktiviranih T reg.

Smatra se da je superoksidni anjon (O_2^-) jedan od inicijatora slobodno radikalskih reakcija. SOD je enzim odgovoran za konverziju O_2^- , važnog ROS, u vodonik peroksid (H_2O_2). U ovoj studiji, tretman alfakalcidolom (12 nedelja), značajno smanjuje aktivnost SOD u eritrocitima pacijenata sa aktivnim RA do nivoa dobijenih u zdravoj kontrolnoj grupi. Slični rezultati su pokazani u studiji Radovici et al.(), gde je pokazano da dvanaestonedeljni tretman alfakalcidolom kod bolesnika sa juvenilnim idiopatskim artritisom (JIA), smanjuje aktivnost SOD do nivoa čak nižeg nego u kontrolnoj grupi zdravih, potvrđujući time ulogu vitamina D u regulaciji redoks sistema ćelije.

Jedno objašnjenje može biti činjenica da je proizvodnja SOD stimulisana kroz Th1 ćelijski i humoralni imunitet, koji su suprimirani tretmanom alfakalcidolom. Slično, u

studiji Cimen i sar. primećeni su viši nivoi SOD kod pacijenata sa RA nego u kontrolnoj grupi, ukazujući na to da bi prekomerna produkcija slobodnih radikala mogla biti pre kroz ksantin - ksantin oksidaza sistem nego kao posledica poremećaja antioksidantnog sistema. Isto tako, Vijaikumar i sar. u svojoj studiji pokazali su povećanje nivoa SOD i GPx koji mogu biti prisutni zbog dismutacije viška superoksidnih radikala koji se generišu i difunduju sa mesta zapaljenja i zbog čega dolazi do povećane ekspresije antioksidativnog sistema odbrane RA pacijenata. Međutim Akiol i sar. i Ozkan i sar. nisu prijavili nikakve promene u nivou aktivnosti SOD između pacijenata sa RA i kontrola.

Međutim naši nalazi su u suprotnosti sa nalazima Chandankhede i sar. i Desai i sar. koji su pokazali smanjenu aktivnost antioksidantnih enzima SOD kod pacijenata sa RA u odnosu na kontrole, ali pacijenti u studijama nisu bili u aktivnoj fazi bolesti.

Osim toga, naši rezultati su pokazali da je dvanaestonedeljni tretman alfakalcidolom promenio odgovor PBMC pacijenata sa aktivnim RA na stimulaciju, sprečavajući proizvodnju O_2^- i depolarizaciju mitohondrijalne membrane, što podržava rezultat smanjene SOD aktivnosti u eritrocitima posle 12 nedelja tretmana kod pacijenata sa RA. S obzirom da je vitamin D membranski antioksidans koji je u stanju da inhibira gvožđe-zavisnu lipozomalnu peroksidaciju membranskih lipida stabilizacijom ćelijske membrane 34, ovaj rezultat pokazuje mogući zaštitni uticaj alfakalcidola na PBMC osetljivost na indukovani oksidativni stres nakon stimulacije.

Ovo bi moglo biti značajno jer je u našim eksperimentima stimulacija dovela do povećanja proizvodnje O_2^- i podsticanja depolarizacije mitohondrijalne membrane, ne samo kod pacijenata pre tretmana, što je u skladu sa rezultatima Bulua i sar. već i u PMBC zdravih kontrola.

CAT i GPx su enzimi uključeni u neutralizaciju H_2O_2 . Dok se reakcijom koju katalizuje CAT proizvodi kiseonik i H_2O , GPx koristi GSH koji se oksidiše tokom reakcije koja proizvodi vodu iz H_2O_2 . U ovoj studiji aktivnost CAT bila je veća u eritrocitima RA pacijenata pre tretmana u poređenju sa kontrolama. Pored zaštite ćelija od oštećenja izazvanog ROS, pokazano je da ekspresija CAT in vitro i in vivo utiče na ekspresiju gena odgovornih za zapaljenje (Benhamou i sar, 1998). Zanimljivo, samo za CAT smo pokazali da dvanaestonedeljna terapija alfakalcidolom

vrlo značajno smanjuje aktivnost ovog enzima do nivoa znacajno nižeg u poređenju sa zdravim kontrolama. Ovaj nalaz snažno podržava mogućnost upotrebe alfacalcidola kao dodatne terapije u RA, jer je CAT zapravo enzim koji pokazuje vodeću ulogu u detoksikaciji H_2O_2 unutar eritrocita, iako je pokazano je da je ovaj enzim snažno povišen u sinovijskoj tečnosti u RA (Biemond i sar, 1994) Naš nalaz postojanja značajne korelacije između promene CAT aktivnosti i nivoa CRP u ukazuju na značajnu ulogu aktivnosti CAT u patogenezi RA.

Pokazano je da u uslovima jakog oksidativnog stresa GPx može biti inaktiviran jer O_2^- može inhibirati funkciju peroksida. (Neupane 2008) Ovo bi moglo objasniti naš nalaz smanjene aktivnosti GPx u eritrocitima pacijenata sa aktivnim RA pre tretmana u poređenju sa kontrolama. Takođe, Cimen i sar utvrdili su da GPx verovatno ne može da igra važnu ulogu u reumatskim bolestima. Afinitet GPx za H_2O_2 je veći nego afinitet katalaze, što čini GPx efikasnijom u uslovima niske koncentracije H_2O_2 .

Smanjena aktivnost GPx uslovlila je smanjeno korišćenje GSH u eritrocitima, čime se može objasniti povećana koncentracija GSH u eritrocitima. Pokazano smanjenje GSH u eritrocitima posle terapije alfacalcidolom pokazuje da pacijenti pokušavaju da vrate normalne nivoe GSH kako se njihovo stanje poboljšava.

Pored nivoa glutationa i aktivnosti antioksidativnih enzima takođe smo procenjivali prisustvo lipidne peroksidacije merenjem nivoa MDA. Naši rezultati su pokazali da su kod pacijenata, nivoi MDA značajno povišeni u poređenju sa kontrolama, ali posle terapije alfacalcidolom pacijenata nivoi MDA u plazmi su bili niži, što je u skladu sa nalazima drugih studija (Radovic i sar 2012; Bao i sar 2008) koje govore u prilog postojanja zaštitne uloge alfacalcidola u pro-oksidativnim uslovima.

Nakon dvanaestonedeljne terapije alfacalcidolom, kod naših pacijenata došlo je do značajnog smanjenja parametara zapaljenja (SE, CRP) i kliničkog poboljšanja procenjenog na osnovu DAS 28 indeksa. Nakon terapije, značajno se promenila i distribucija pacijenata prema nivou aktivnosti bolesti. Na početku studije, najveći broj pacijenata je bio u grupi visoke aktivnosti bolesti dok je svega 16 % pacijenata bilo u grupi umerene aktivnosti bolesti. Nije bilo pacijenata sa niskom aktivnošću bolesti. Posle terapije alfacalcidolom, samo 16 % pacijenata je ostalo u grupi visoko aktivne bolesti, dok su svi ostali imali umereno aktivnu bolest i nisku aktivnost bolesti.

Nijedan bolesnik nije isključen iz ispitivanja zbog neželjenih efekata. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima studije Anđelković i sar. u kojoj je pokazano da je kod 89% bolesnika sa RA nakon tri meseca terapije alfakalcidolom došlo do pada aktivnost bolesti procenjene Ritchi indeksom, a kod 45% obolelih je došlo i do kompletne remisije bolesti. Tokom tri meseca ovog ispitivanja otvorenog tipa, ni kod jednog od 19 RA bolesnika, nisu uočeni značajni neželjeni efekti. Nivoi serumskog kalcijuma i jonizovanog kalcijuma ostali su u fiziološkom opsegu. U studiji Gaal i sar. koja je sprovedena na bolesnicima sa psorijaznim artritismom pokazano je da terapija alfakalcidolom dovodi do smanjenja aktivnosti bolesti kao i do supresije Th1 imunskog odgovora.

Poznato je da upotreba alfakalcidola umesto $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ omogućava korišćenje većih doza sa manjim rizikom od hiperkalcemije, što povećava njegov potencijal kao terapijskog agensa (Lau i Baylink, 1999).

U našoj studiji praćena je i koncentracija 25OHD_3 posle terapije alfakalcidolom. Forma $25(\text{OH})\text{D}$ ima najveću koncentraciju u humanom serumu i najstabilniji je metabolit vitamina D, sa visokim afinitetom se vezuje za serumski vitamin D vezujući protein u krvi kao i za druge proteine iz superfamilije albumina. Kao takav, $25(\text{OH})\text{D}$ u serumu je najbolji pokazatelj dostupnog vitamina D u domaćina, nastalog ili sintezom u kozi ili unosom putem ishrane. Ipak, ovaj oblik još uvek nije hormon; on je zapravo prehormon prirodnog hormona i skoro da ne vrši bilo kakvu biološku ulogu u organizmu (Nuti i sar, 2006). Kao rezultat negativne povratne sprege kojom se kontrolise poslednji korak aktivacije $25(\text{OH})\text{D}$ u aktivnu formu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ u bubrezima, suplementacija običnim vitaminom D nikada neće dovesti do povećanja nivoa hormona D do nivoa koji može imati imunomodulatorne i/ili antioksidativne efekte. 46,44 (Nordin i sar. 1999; Lau i Baylink, 1999). U našoj studiji smo pokazali da nema značajne promene u nivou $25(\text{OH})\text{D}$ kod pacijenata sa aktivnim RA pre i posle dvanaestonedeljnog tretmana alfakalcidolom. U skladu sa tim, značajno je naglasiti da merenje $25(\text{OH})\text{D}$ nivoa, kao jedinog standardizovanog pokazatelja stanja vitamina D u organizmu, zapravo predstavlja samo odraz ravnoteže između njegovog unosa hranom i/ili suplementacije vitaminom D i njegovog korišćenja u lokalnim tkivima kao aktivnog hormona D (Cutolo i Pizzorni, 2011) što ne odražava nivo aktivnog hormona D.

Uprkos ranijim uverenjima, nedavno je pokazano da alfa-kalcidol, in vitro, deluje direktno na produkciju proinflammatoryh i antiinflammatoryh citokina bez potrebe da bude dodatno hidroksilisan na poziciji 25 (Vojinovic i sar, 2012).

7. ZAKLJUČCI

1. Alfakalcidol na isti način kao i kalcitriol moduliše produkciju citokina u kulturama mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih osoba i obolelih od Reumatoidnog artritisa.
2. Kod zdravih osoba u kulturama stimulisanih mononuklearnih ćelija periferne krvi:
 - Suplementacija alfakalcidolom dovodi do statistički značajnog smanjenja produkcije proinflamatornih citokina IL-17, IL-21 i TNF- α i značajnog porasta produkcije anti-inflamatornih citokina IL-4 i IFN- γ ;
 - Suplementacija metilprednizolonom dovodi do statistički značajnog porasta produkcije IL-17, IL-4 i IFN- γ , dok blago povećanje produkcije IL-21 nije dostiglo nivo statističke značajnosti;
 - Istovremena suplementacija alfakalcidolom i metilprednizolonom dovodi do dodatnog, još potenciranijeg statistički značajnog povećanja produkcije IL-4 i IFN- γ , i smanjenja produkcije IL-17 i IL-21.
3. Stimulisane kulture mononuklearnih ćelija periferne krvi, bez suplementacije, bolesnika sa Reumatoidnim artritisom imaju značajno veću produkciju TNF- α i IFN- γ u odnosu na kulture zdravih osoba.
4. Kod bolesnika sa Reumatoidnim artritisom u kulturama stimulisanih mononuklearnih ćelija periferne krvi:
 - Suplementacija alfakalcidolom dovodi do statistički veoma značajnog smanjenja produkcije proinflamatornih citokina IL-17, IL-21 i TNF- α , s tim da smanjenje IL-6 nije dostiglo statističku značajnost što je praćeno značajnim porastom produkcije anti-inflamatornih citokina IL-4, TGF- β i IFN- γ s tim da porast produkcije IL-10 nije dostigao statističku značajnost;
 - Suplementacija kalcitriolom dovodi do uporedive (bez statistički značajne razlike) modulacije citokina u odnosu na tretman alfakalcidolom, osim produkcije TGF- β koja je bila smanjena;
 - Suplementacija metilprednizolonom dovodi do značajnog smanjenja produkcije IL-6, IL-17, TNF- α i IL-4, dok povećanje produkcije IL-21, IL-10 i IFN- γ nije bilo značajno;

- Istovremena suplementacija alfa-kalcidolom i metilprednizolonom dovodi do dodatnog, još izraženijeg smanjenja produkcije IL-17 i TNF- α .
5. Kod bolesnika sa Reumatoidnim artritismom oralna terapija sa 2mcg alfa-kalcidola dnevno u toku 12 nedelja dovela je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti bolesti merenog DAS28 (SE) skorom (Δ DAS28 >1,5), i značajnog smanjenja nivoa C-reaktivnog proteina.
 6. Posle 12 nedelja terapije alfa-kalcidolom u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa Reumatoidnim artritismom dolazi do statistički veoma značajnih promena stimulisane produkcije proinflamatornih i anti-inflamatornih citokina. Produkcija IL-6, IL-17 i TNF- α je statistički značajno niža dok je produkcija IL-10, TGF- β i IFN- γ statistički značajno viša u odnosu na vrednosti pre terapije.
 7. Procenat aktiviranih regulatornih T limfocita u perifernoj krvi bolesnika sa aktivnim RA je bio niži u odnosu na kontrolnu grupu zdravih. Posle 12 nedelja terapije alfa-kalcidolom dolazi do povećanja procenta aktiviranih T regulatornih ćelija i to do nivoa koji je zabeležen u grupi zdravih kontrola.
 8. Primena terapije alfa-kalcidolom u toku 12 nedelja značajno je modulirala parametre oksidativnog stresa u perifernoj krvi bolesnika sa aktivnim Reumatoidnim artritismom u pravcu antioksidativne zaštite
 - Primena terapije alfa-kalcidolom u toku 12 nedelja značajno je modulirala aktivnost enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima bolesnika sa Reumatoidnim artritismom, dovodeći do smanjenja aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze i nivoa glutaciona. Uz to, utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između promene aktivnosti katalaze i promene nivoa CRP-a pre i posle tretmana alfa-kalcidolom.
 - Nakon dvanaest nedelja oralne terapije sa 2mcg alfa-kalcidola dnevno došlo je do značajnog smanjenja proizvodnje superoksidnog anjona i odsustva depolarizacije unutrašnje mitohondrijalne membrane mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa Reumatoidnim artritismom.
 - Bolesnici sa aktivnim Reumatoidnim artritismom imaju statistički značajno viši nivo malon-dialdehida u plazmi u poređenju sa kontrolnim zdravim osobama. Terapija oralnim alfa-kalcidolom u dozi 2 mcg na dan dovela je do statistički značajnog sniženja nivoa malon-dialdehida.

8. LITERATURA

1. Adams, J.S. & M. Hewison. 2010. Update in vitamin D. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95: 471–478
2. Adams JS, Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4:80-90.
3. Adamopoulos I.E., Chao C.C., Geissler R. Interleukin-17 A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors, *Arthritis Res. Ther.* 12 (2010) R29
4. Adorini A, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4:404-12
5. Adorini, L. 2002. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 analogs as potential therapies in transplantation. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 3: 1458–1463
6. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. 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.
7. Aggarwal S, Ghilardi N, XieMH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by a production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003;278:1910–4
8. Agarwal S., Misra R., Aggarwal A. Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases, *J. Rheumatol.* 2008;35:515–519.
9. Ait-Outfella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 2006;12:178–80

10. Akyol O, Isci N, Temel I, Ozgocmen S, Uz E. The relationships between plasma and erythrocyte antioxidant enzymes and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2001;68:311-7.
11. Alele JD, Kamen DL. The importance of inflammation and vitamin D status in SLE associated osteoporosis. *Autoimmun Rev* 2010;3:137-9
12. Aletaha D et al. Rheumatoid arthritis classification criteria an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism. *Arthritis Rheum* 2010;62:2569-81
13. Aletaha D, Neogi T, Silman JA, i sar. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis & Rheumatism*. 2010;62:2569-2581.
14. Alvarado-Sanchez B, Hernandez-Castro B, Portales-Perez D, Baranda L, Layseca- Espinosa E, Abud-Mendoza C, et al. Regulatory T cells in patientswith systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2006;27:110-8.
15. Andjelkovic Z, Vojinovic J, Pejnovic N, Popovic M, Dujic A, Mitrovic D, et al. Disease modifying and immunomodulatory effects of high dose 1 alpha (OH) D3 in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:453-6.
16. Antico, A. et al. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. *Autoimmun Rev*. 2012;12:127-136
17. Arkema, E.V., J.E. Hart, K.A. Bertrand, et al. Exposure to ultraviolet-B and risk of developing rheumatoid arthritis among women in the Nurses' Health Study. *Ann. Rheum. Dis*. 2013;72:506-511.
18. Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new etiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis* 2007; 66:1137-42

19. Aarvak T, Chabaud M, Miossec P, Natvig JB. IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. *J Immunol* 1999;162:1246–51.
20. Aarvak T, Chabaud M, Kallberg E, Miossec P, Natvig JB. Change in the Th1/Th2 phenotype of memory T-cell clones from rheumatoid arthritis synovium. *Scand J Immunol* 1999;50:1–9.
21. Apparailly F, Verwaerde C, Jacquet C. Adenovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene inhibits murine Collagen-induced arthritis, *J. Immunol.* 1998;160:5213–5220
22. Arvikar S.L, Collier D.S., Fisher M.C. Clinical correlations with porphyromonas gingivalis antibody responses in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2013;15 R109
23. 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;105:735–41.
24. Bandeira F, Griz L, Dreyer P, Eufrazino C, Bandeira C, Freese E. Vitamin D deficiency: a global perspective. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50(4):640-6.
25. Bao BY, Ting HJ, Hsu JW, Lee YF. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer* 2008;122:2699-706
26. Baráth S, Sipka S, Szodoray P, Szegedi A, AlekszaM, Vegh J, et al. Regulatory T cells in peripheral blood of patients with mixed connective tissue disease. *Scand J Rheumatol* 2006;35:300–4.
27. Bartels LE, Jorgensen SP, Agnholt J, Kelsen J, Hvas CL, Dahlerup JF. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and dexamethasone increase interleukin-10 production in CD4+ T cells from patients with Crohn's disease. *Int Immunopharmacol* 2007;7:1755–64.

28. Bayry J, Siberil S, Triebel F, Tough DF, and Kaveri SV. Rescuing CD4+CD25+ regulatory T-cell functions in rheumatoid arthritis by cytokine-targeted monoclonal antibody therapy. *Drug Discovery Today*. 2007;12(13-14):548–552.
29. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature Reviews Immunology*. vol. 2007; 7(11):875–888
30. Benhamou PY et al. Adenovirus-mediated catalase gene transfer reduces oxidant stress in human, porcine and rat pancreatic islets. *Diabetologia* 1998;41:1093-1100
31. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H) 17 cells. *Nature* 2008;453:1051–7
32. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235–238
33. Biemond, P, Swaak AJG and Koster JF. Protective factors against oxygen free radicals and hydrogen peroxide in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis & Rheumatism*. 1984; 27: 760–765
34. Bjelakovic, G. et al. Vitamin D supplementation for prevention of mortality in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2011;7:CD007470.
35. Bouillon, R. et al. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocrine. Rev.* 1995;16:200–257
36. Bodolay E, Aleksza M, Antal-Szalmás P, Végh J, Szodoray P, Soltész P, et al. Serum cytokine levels, type 1 and intracellular T cell cytokine profiles in mixed connective tissue disease. *J Rheumatol* 2002;29:2136–42.
37. Borba VZ, Vieira JG, Kasamatsu T, Radominski SC, Sato EI, Lazaretti-Castro M. Vitamin D deficiency in patients with active systemic lupus erythematosus. *Osteoporosis Int* 2009;20:27–33.

38. Brennan F and McInnes I. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 2008;118:3537–3545.
39. Bringhurst FR, Demay MB, Kronenberg HM. Hormones and Disorders of Mineral Metabolism. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR editors. *Williams Textbook of Endocrinology*, 11 ed. Philadelphia: Elsevier, 2008.
40. Bulua A. C., Simon A., Maddipati R., Pelletier M, Park H., Kim K.Y., Sack M. N., Kastner D. L., Siegel R. M. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *Journal of Experimental Medicine.* 2011; 208(3) 519–533.
41. Canning MO, Grotenhuis K, de Wit H, Ruwhof C, Drexhage HA. 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *Eur J Endocrinol* 2001;145(3):351-7
42. Cantorna MT, Mahon B. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Bio Med (Maywood)* 2004; 229(11):1136-42.)
43. Cantorna, M.T. et al. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J. Nutr.* 2000;130: 2648–2652
44. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25- dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *J Nutr* 1998;128(1):68-72.
45. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(15):7861-4
46. Carlberg, C. & F.Molnar. Current status of vitamin D signaling and its therapeutic applications. *Curr. Topics Med. Chem.* 2012;12: 1–20

47. Carlberg, C. Molecular basis of the selective activity of vitamin D analogues. *J. Cell. Biochem.* 2003;88: 274–281
48. Casteels K, Bouillon R., Waar M., Mathieu C.: Immunomodulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Curr. Opin. Nephrol. Hypert.* 1995;4:313-318
49. Casteels, K. et al. Prevention of autoimmune destruction of syngeneic islet grafts in spontaneously diabetic nonobese diabetic mice by a combination of a vitamin D₃ analog and cyclosporine. *Transplantation* 1998;65: 1225–1232.)
50. Chandankhede M, Gupta M. Oxidative stress and antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Biol Med Res* 2013;4(2):3088-3090.
51. Chang JH, Cha HR, Lee DS, Seo KY, Kweon MN (2010) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Inhibits the Differentiation and Migration of T_H17 Cells to Protect against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. 2010; *PLoS ONE* 5(9): e12925. doi: 10.1371/journal.pone.0012925
52. Chawla, A. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 2001;294:1866–1870
53. Cheng, J.B. et al. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101:7711–7715
54. Choy EH, Isenberg DA, Garrood T. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 3143–50
55. Cimen MY, Cimen OB, Kacmaz M, Ozturk HS, Yorgancioglu R, Durak I. Oxidant/ antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2000; 19(4):275-7
56. Colin EM, Asmawidjaja PS, van Hamburg JP, i sar. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Modulates Th17 Polarization and Interleukin-22 Expression by Memory T Cells From Patients With Early Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism.* 2010;62:132–142.

57. Costenbader KH, Feskanich D, Holmes M, Karlson EW, Benito- Garcia E. Vitamin D intake and risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in women. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:530-5.
58. Cutolo,M. et al. Vitamin D endocrine system involvement in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun. Rev.* 2011;11: 84–87.
59. Cutolo M. Vitamin D and autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatology* 2011;38 (1):53-59
60. Cutolo M, Otsa K, Laas K, i sar. Circannual vitamin D serum levels and disease activity in rheumatoid arthritis: Northern versus Southern Europe. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24:702-7.
61. Daniel C, Radeke HH, Sartory NA, Zahn N, Zuegel U, Steinmeyer A, et al. The new low calcemic vitamin D analog 22-ene- 25-oxa-vitamin D prominently ameliorates T helper cell type 1-mediated colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319(2): 622-31
62. Dayer J.M, Choy E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology* 2010;49:15–24
63. De Antonio, Blotta HM, Mamoni RL, Louzada P, Bertolo MB, Foss NT, et al. Effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation and cytokine production in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002;29:46–51
64. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D – its role and uses in immunology. *FASEB Journal* 2001;15:2579-85
65. De Luca, H. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004;80:1689S– 1696S
66. Desai PB, Manjunath S, Kadi S, Chetana K, Vanishree J. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in rheumatoid arthritis: a case control study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* Nov 2010;14(11):959-67
67. Dighiero, Rose. Critical self-epitopes are key to the understanding of selftolerance and autoimmunity. *Immunol Today.*1999;20:423-8

68. Diniz Lopes Marques C., Tavares Dantas A., Sotero Fragoso T., Luzia Branco Pinto Duarte A.. The importance of vitamin D levels in autoimmune diseases. *Bras J Rheumatol* 2010;50(1):67-80
69. Doria A, Arienti S, Rampudda M, Canova M, Tonon M, Sarzi-Puttini P. Preventive strategies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2008;3:192–7.
70. Dukas L, Bischoff HA, Lindpaintner LS, Schacht E, Birkner-Binder D, Damm TN, et al. Alfacalcidol reduces the number of fallers in a community-dwelling elderly population with a minimum calcium intake of more than 500 mg daily. *JAGS* 2004;52:230–6.
71. Eduardo-Canosa, S. et al. Design and synthesis of active vitamin D analogs. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2010.121: 7–12
72. Epple H.J., Loddenkemper C, Kunkel D, Troger H, Maul J, Moos V, Berg E, Ullrich R, Schulzke J.D, Stein H, Duchmann R, Zeitz M, Schneider T. Mucosal but not peripheral FOXP3₊ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. *Blood.* 2006;108: 3072-3078
73. En-Yin W, Qin Y, Zhi-Gang L. Association of polymorphisms in interleukin 12 genes (IL-12 A and -B) with rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Clin. Exp. Immunol.* 2015;180:83–89
74. Ettinger R, Kuchen S, Lipsky P.E. The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease, *Immunol. Rev.* 2008;223:60–86
75. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN . Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996;85: 307–10
76. Finnegan A., K. Mikecz, P. Tao, et al., Proteoglycan (aggrecan) - induced arthritis in BALB/c mice is a Th1- type disease regulated by Th2 cytokines, *J. Immunol.* 1999;163:5383–5390.

77. Firestein GS. Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis, in: G.S. Firestein, R.C. Budd, E.D.J. Harris, I.B. McInnes, S. Ruddy, J.S. Sargent (Eds.), *Kelley's Textbook of Rheumatology*, eighth ed. Saunders, Philadelphia, PA, 2009
78. Fritsche J, Mondal K, Ehrnsperger A, Andreesen R, Kreutz M. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells. *Blood* 2003;102(9):3314-6.,
79. Fry L and Baker B S. Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clinics in Dermatology*. 2007;25(6):606–615
80. Gambinery E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:430–5.
81. Garcion E, Sindji L, Leblondel G, Brachet P, Darcy F. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. *J Neurochem* 1999;73:859–66
82. Gartlehner G, Hansen RA, Jonas BL, Thieda P, Lohr KN. The comparative efficacy and safety of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis. *J Rheumatol* 2006;33:2398–408.
83. Gauzzi MC, Purificato C, Donato K, Jin Y, Wang L, Daniel KC, et al. 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(1):270-6
84. Gerry K. Schwalfenberg. A review of the critical role of vitamin D in the functioning of the immune system and the clinical implications of vitamin D deficiency. *Mol. Nutr. Food Res*. 2011;55:96–108
85. Gershon R. K. and Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 1970;18(5):723–737

86. Goldrath i Bevan. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*. 1999;402:255-62.
87. Gomez-Vaquero C, Fiter J, Enjuanes A, Nogues X, Diez-Perez A, Nolla JM. Influence of the Bsm1 polymorphism of the vitamin D receptor gene on rheumatoid arthritis clinical activity. *J Rheumatol* 2007;34:1823-6
88. Gonzalez A, Maradit KH, Crowson CS et al. The widening mortality gap between rheumatoid arthritis patients and the general population. *Arthritis Rheum* 2007;56:3583-7.
89. Goodnow, Glynne, Akkaraju, Rayner, Mack, Healy, Chaudhry, Miosg, Wilson, Papathanasiou, Loy. Autoimmunity, self-tolerance and immune homeostasis: from whole animal phenotypes to molecular pathways. *Adv Exp Med Biol*. 2001;490:33-40
90. Góth, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta* 1991;196:143-151.
91. Griffin MD, Xing N, Kumar R. Vitamin D and its analogs as regulators of immune activation and antigen presentation. *Annu Rev Nutr* 2003;23:117-45
92. Griffin MD, Lutz W, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R. Dendritic cell modulation by 1 α ,25 dihydroxyvitamin D₃ and its analogs: a vitaminDreceptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(12):6800-5
93. Gunzler WA, Kremers H and Floha L. An Improved Coupled Test Procedure for Glutathione Peroxidase (EC 1.11,1.9.) in Blood. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 1974;12:444-448
94. Gysemans CA, Cardozo AK, Callewaert H, Giulietti A, Hulshagen L, Bouillon R, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates expression of chemokines and cytokines in pancreatic islets: implications for prevention of diabetes in nonobese diabetic mice. *Endocrinology* 2005;146(4):1956-64.).

95. Hajas A, Sandor J, Csathy L i sar. Vitamin D insufficiency in a large MCTD population. *Autoimmunity Reviews*. 2011;10:317-324
96. Harris Jr ED, Schur PH. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *UpToDate*, Basow, DS (Ed), *UpToDate*, Waltham, MA, 2007
97. Harrington LW, Hatton RD, Mangan PE i sar. Interleukin-17 producing CD4+ effector cells developi via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunol* 2005;6(11):1123-32
98. Han G. M, Neil-Andersen N. J. O., Zurier R. B, and Lawrence D. A. CD4+CD25high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cellular Immunology*, vol. 2008;253(1-2): 92–101
99. Hassan SZ, Gheita TA, Kenawy SA, Fahim AT, El-Sorougy IM, Abdou MS. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity. *Int J Rheum Dis*. 2011;14(4):325-31
100. Haussler MR et al. The nuclear vitamin D receptor controls the expression of genes encoding factors which feed the "Fountain of Youth" to mediate healthful aging. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;121(1-2):88-97
101. Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, Pedersen LB. The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)* 2003;49:277–300
102. Hein, G. & P. Oelzner. Vitamin D metabolites in rheumatoid arthritis: findings–hypotheses—consequences. *Z. Rheumatol*. 2000;59: 28–32.
103. Heine G, Niesner U, Chang HD i sar. 1,25-dihydroxyvitamin D3 promotes IL-10 production in human B cells. *Eur J Immunol* 2008;38:2210-2218
104. Helming L, Bose J, Ehrchen J, Schiebe S, Frahm T, Geffers R, et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 is a potent suppressor of interferon gamma-mediated macrophage activation. *Blood* 2005;106(13):4351-8

105. Hewison M, Freeman L, Hughes SV, Evans KN, Bland R, Eliopoulos AG, et al. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2003;170(11):5382-90
106. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39:365-79.
107. Honorati M.C., Neri S., Cattini L. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts, *Osteoarthr. Cartil.* 2006;14:345–352.
108. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357:266-281
109. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057–61.
110. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299:1057-61
111. Hossein-Nezhad A, and Holick M.F. Optimize dietary intake of vitamin D: an epigenetic perspective. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2012;15: 567–579
112. Huhtakangas, J.A. et al. The vitamin D receptor is present in caveolae enriched plasma membranes and binds 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ in vivo and in vitro. *Mol. Endocrinol.* 2004;18: 2660–2671
113. Hidalgo A, Trump D, Johnson C. Glucocorticoid regulation of the vitamin D receptor. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2009;121:372–375
114. Imazeki I, Matsuzaki J, Tsuji K, Nishimura T. Immunomodulating effect of vitamin D₃ derivatives on type-1 cellular immunity. *Biomedical Research* 2006;26(1)1-9
115. Jadidi-Niaragh F. and Mirshafiey A., “Regulatory T-cell as orchestra leader in immunosuppression process of multiple sclerosis,” *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 2011;33(3):545–567.

116. Jirapongsananuruk, Melamed I, Leung D. Additive immunosuppressive effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and corticosteroids on TH1, but not TH2, responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(5):981-5
117. Jones BJ, Twomey PJ. Issues with vitamin D in routine clinical practice. *Rheumatology* 2008; 47:1267-68
118. Joosten L.A.B., E. Lubberts, P. Durez, et al., Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen- induced arthritis: protective effect of interleukin- 4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction, *Arthritis Rheum.* 1997;40:249–260
119. Joel A.G.R.O., Floris P.J.G.L., Bijlsma J.W.J, Synergistic activity of interleukin-4 and interleukin- 10 in suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 2001;44:3–12
120. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 1998;78(4): 1193-231
121. Jonuleit H.and Schmitt E., “The regulator T cell family: distinct subsets and their interrelations,” *Journal of Immunology*, 2003;171:6323–6327.
122. Jordan M. S., A. Boesteanu, A. J. Reed et al., “Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide,” *Nature Immunology*, 2001;(4):301–306,
123. Jurutka, P.W. et al. Vitamin D receptor: key roles in bone mineral pathophysiology, molecular mechanism of action, and novel nutritional ligands. *J. Bone Miner. Res.* 2007;22:V2–V10
124. Kamen DL, Cooper GS, Bouali H, Shaftman SR, Hollis BW, Gilkeson GS. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2006; 5:114-7.

125. Katalin É. Szabó-Taylor, György Nagy, Paul Eggleton, Paul G. Winyard. Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice* 2013;22:145-167
126. Khattri R, Cox T, Ysayko SA, Rasdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003;4:337–42
127. Kerstin K., Steffen G., Epigenetics in rheumatoid arthritis, *Curr. Opin. Rheumatol.* 2015;27:76–82.
128. Kiran G, Debashish D. Vitamin D and rheumatoid arthritis: is there a link? *Int J Rheum Dis.* 2008;11:206-211
129. Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, Juhasz KM, Bird PA, Lee CS, et al. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum* 2006;54:1122–31
130. Kong J, Zhang Z, Musch MW, Ning G, Sun J, Hart J, et al. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294(1):G208-16
131. Kronenberg M. and Rudensky A., “Regulation of immunity by self-reactive T cells,” *Nature*, vol. 2005;435:598– 604.
132. Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med* 2008;205:1535–41
133. Ku IA, Imboden JB, Hsue PY, Ganz P. Rheumatoid arthritis: model of systemic inflammation driving atherosclerosis. *Circ J* 2009;73:977–85S
134. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, et al. Multiple immunoregulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 2002;109:131–40.

135. Koenders M.I., Lubberts E., Oppers-Walgreen B. Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1, *Am. J. Pathol.* 167 (2005) 141–149.
136. Kikly K, Liu L, Na S, and Sedgwick J. D. The IL-23/Th17 axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 2006;18(6)670–675
137. Kunz M and Ibrahim S. Cytokines and Cytokine Profiles in Human Autoimmune Diseases and Animal Models of Autoimmunity. *Mediators of Inflammation*. 2009. doi:10.1155/2009/979258
138. Lamb EJ, Wong T, Smith DJ, Simpson DE, Coakley AJ, Moniz C. Metabolic bone disease is present at diagnosis in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16(11):1985-92.
139. Lan R. Y., Ansari A. A., Lian Z. X., and Gershwin M. E., “Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity,” *Autoimmunity Reviews*, 2005;4(6):351–363.
140. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201:233–40.
141. Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 2001;106(3):263-6
142. Larsson, P. 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
143. Leitinger N. The role of phospholipid oxidation products in inflammatory and autoimmune diseases: evidence from animal models and in humans. *Subcell Biochem.* 2008; 49:325–50.

144. Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang X. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of hematology & oncology* 2013;6:19-21
145. Lemire JM, Ince A, Takashima M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity* 1992;12(2):143-8.
146. Lemire JM. Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Cell Biochem* 1992;49(1):26-31
147. Lemire JM, Archer DC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 1991;87(3):1103-7
148. Leventis P, Patel S. Clinical aspects of vitamin D in the management of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2008; 47:1617-21
149. Linker-Israeli M, Elstner E, Klinenberg JR, Wallace DJ, Koeffler HP. Vitamin D(3) and its synthetic analogs inhibit the spontaneous in vitro immunoglobulin production by SLE-derived PBMC. *Clin Immunol* 2001; 99:82-93.
- 150.** Lipps, P. Which circulating level of 25-hydroxyvitamin D is appropriate? *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004: 611-4
151. Lonard, D.M. et al. Nuclear receptor coregulators and human disease. *Endocr. Rev.* 2007;28:575–587
152. Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine* 2007;41:84–91.
153. Lubberts E, Joosten LA, Chabaud M, van Den Bersselaar L Oppers B, Coenen-De Roo CJ, et al. IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. *J Clin Invest* 2000;105:1697–710.

154. Lyssuk EY, Torgashina AV, Soloviev SK, Nassonov EL, Bykovskaia SN. Reduced number and function of CD4+CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol* 2007;601:113–9
155. Maalej, A. Association study of VDR gene with rheumatoid arthritis in the French population. *Genes Immun.* 2005;6:707–711
156. Mahon BD, Wittke A, Weaver V, Cantorna MT. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem* 2003;89(5):922-32
157. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human Th-17 cells requires transforming growth factor - beta and induction of the nuclear receptor ROR γ T. *Nat Immunol* 2008; 9(6):641-9.
158. Manolagas SC, Werntz DA, Tsoukas CD, Provvedini DM, Vaughan JH. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Lab Clin Med* 1986; 108:596-600.
159. Margolis, R.N. & S. Christakos.. The nuclear receptor superfamily of steroid hormones and vitamin D gene regulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010;1192: 208–214.
160. Marotte H, Pallot-Prades B, Grange L, Gaudin P, Alexandre C, Miossec P. A 1-year case-control study in patients with rheumatoid arthritis indicates prevention of loss of bone mineral density in both responders and nonresponders to infliximab. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R61
161. Marrack, Kappler, Kotzin. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med.* 2001;7:899-905
162. Mauri C. and Carter N. Is there a feudal hierarchy amongst regulatory immune cells? More than just Tregs. *Arthritis Research & Therapy*, 2009;11:237.

163. Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50(1):72-7
164. Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R, Tutor-Ureta P, Yebra-Bango M, Andreu JL, et al. Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2006;65:553–4.
165. Mills K. H. G. “Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?” *Nature Reviews Immunology*, 2004;4(11):841–855,
166. Moe S, Wazny LD, Martin JE. Oral calcitriol versus oral alfacalcidol for the treatment of secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis: a randomized, crossover trial. *Can J Clin Pharmacol* 2008;15:36–43.
167. Monkawa T, Yoshida T, Hayashi M, Saruta T. Identification of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression in macrophages. *Kidney Int* 2000;58(2):559-68
168. Mora, R. et al. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8: 685–698
169. Mora JR., Iwata M and von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature Reviews.* 2008;8:685-698
170. Morales-Tirado V, Wichlan GD, Leimig ET, et al. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) catalyzes suppressive activity on human natural regulatory T cells, uniquely modulates cell cycle progression, and augments FOXP3. *Clinical Immunology.* 2011;138:201-221
171. Moreno J, Krishnan AV, Swami S, Nonn L, Peehl DM, Feldman D. Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2005;65(17):7917-25

172. Mosca M, Tani C, Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD): a new frontier for rheumatology. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007;21:1011–23
173. 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;140:360–7.
174. Mottonen M, Isomaki P, Saario R. Interleukin-10 inhibits the capacity of synovial macrophages to function as antigen-presenting cells, *Br. J. Rheumatol.* 1998;37:1207–1214
- 175.** Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernán MA, Olek MJ, Willett WC, et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 2004;62:60–5.
176. Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E i sar. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology.* 2004;62:60–5
177. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro-and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003;198:1951–7.
178. Nagant de Deuxchaisnes C, Devogelaer JP, Nayer P. Comparison of 1,25(OH)₂D₃ levels after the administration of calcitriol and alfacalcidol. Gene regulation structure–function analysis and clinical application. *Proceedings of the Eighth Workshop on Vitamin D. Paris, France.* 1991;2:314–315
179. Neogi T., Aletaha D. Silman A. J, Naden R. L., Felson D. T., Aggarwal R., Bingham C. O., Birnbaum N. S., Burmester G. R., Bykerk V. P, Cohen M. D., Combe B., Costenbader K. H., Dougados M., Emery P., Ferraccioli G., Hazes J. M. W., Hobbs K., Huizinga T. W. J., Kavanaugh A., Kay J., Khanna D., Kvien T. K., Laing T., Liao K., Mease P., Ménard H. A., Moreland L. W., Nair R., Pincus T., Ringold S., Smolen J. S., Stanislawski-

- Biernat E., Symmons D., Tak P. P., Upchurch K. S., Vencovský J., Wolfe F., Hawker G., *Arthritis. Rheum.* 2010;62:2569
180. Nossal. A purgative mastery. *Nature* 2001;412:685-686
181. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocrine Reviews* 2005; 26(5):662-87
182. Nielen MMJ, Schaardenburg D, Lems WF, van de Stadt RJ, de Koning MHM, Reesink HW et al. Vitamin D deficiency does not increase the risk of rheumatoid arthritis: comment on the article by Merlino et al. *Arthritis Rheum* 2006;54(11):3719-24
183. Niu X D, Zhang H X. IL-21 regulates Th17 cells in rheumatoid arthritis. *Hum. Immunol.* 2010;71:334–341
184. Norman, A.W. Vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 2006;147:5542–5548
185. Norman AW, Henry HL, Bishop JE, et al. Different shapes of the steroid hormone 1, 25(OH)₂-vitamin D₃ act as agonists for two different receptors in the vitamin D endocrine system to mediate genomic and rapid responses. *Steroids.* 2001;66:147-158
186. Nagy, L. & J.W. Schwabe. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* 2004;29:317– 324
187. Nagpal, S. et al. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr. Rev.* 2005;26: 662–687.
188. Narlikar, G.J. et al. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 2002;108: 475–487
189. Neupane DP, Majhi S, Chandra L, Rijal S, Baral N. Erythrocyte glutathione status in human visceral leishmaniasis. *Indian J Clin Biochem.* 2008;23(1):95-7

190. Ohno J, Kubota M, Hirasawa Y, Suzuki M, Mimura N, Minamikata. Clinical evaluation of 1-hydroxycholecalciferol and 1,25-dihydroxycholecalciferol in the treatment of renal osteodystrophy. *Vitamin D, chemical, biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism. Proceeding of the 5th Workshop of Vitamin D.*1982; 847–852
191. Okano T.: 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ analogues with selective biological functions can be developed by manipulations of their binding properties for vitamin D-binding protein. In Potts J.T., Ogata E. (Eds.): *IBF Proceeding of Second International Forum on Calcified Tissue and Bone Metabolism*, 1993;5:34-7.
192. Ozkan Y, Yardym-Akaydyn S, Sepici A, Keskin E, Sepici V, Simsek B. Oxidative status in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2007;26(1):64-8
193. Papapoulos SE, Berg H, Frolich M, Valentijn RM. Circulating 1,25-dihydroxycholecalciferol after intravenous injections of 1 alpha-hydroxycholecalciferol in patients on regular haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1988;3:647–650
194. 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; 56:2143-9
195. 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(5):2405-11
196. Pennington D. J., Silva-Santos B., Silberzahn T.et al., “Early events in the thymus affect the balance of effector and regulatory T cells,” *Nature*, vol. 2006;444:1073–1077.
197. Petrovic-Rackov L., Pejnovic N., Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF α measurement in rheumatoid arthritis, *Clin. Rheumatol.* 2006;25:448–452

198. Pia I, Juha P. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis, *Ann. Med.* 1997;29:499–507.
199. Plenge RM. Rheumatoid arthritis genetics: 2009 update. *Curr Rheumatol Rep* 2009;11:351-6.
200. Prevoe MLL, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LBA, van Riel PLCM Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts: development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:44–8.
201. Ranganathan, P. Genetics of bone loss in rheumatoid arthritis—role of vitamin D receptor polymorphisms. *Rheumatology* 2009;48: 342–346.
202. Radovic J, Lazarevic D, Nikolic I, Vojinovic J. Effect of Alfacalcidol on Oxidative Stress and Disease Activity in JIA Patients. *Ann Paediatr Rheum* 2012;1(2):126-132
203. Raza K, Falciani F, Curnow SJ, Ross EJ, Lee CY, Akbar AN, et al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R784–95.
204. Razin, A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *EMBO J.* 1998;17:4905– 4908
205. Rausch-Fan X, Leutmezer F, Willheim M, Spittler A, Bohle B, Ebner C, et al. Regulation of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells and allergen-specific Th cell clones by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128:33–41
206. Richard M.P, Shiva S. Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2013;9:252–256
207. Richy F, Deroisy R, Lecart MP, Hanssens L, Mawet A and Reginster J Y. D. Hormone analog alfacalcidol: an update on its role in post-menopausal

- osteoporosis and rheumatoid arthritis management. *Aging Clinical and Experimental Research*. 2005; 17: 133-142
208. Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Olivares N, Martinez-Berriotxo A, Aguirre C. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology* 2008;47:920-3
209. Ringe JD, Schacht E. Improving the outcome of established therapies for osteoporosis by adding the active D-hormone analog alfacalcidol. *Rheumatol Int* 2007;28:103–11.
210. Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthritis Res Ther* 2008;10:206–18.
211. Roeleveld DM, Koendres MI. The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy. *Cytokine* 2015;74:101-107.
212. Sarah L.G, Role of IL-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Curr. Rheumatol. Rep.* 2009;11:365–370.
213. Sarkar S., Cooney L.A., White P. Regulation of pathogenic IL-17 responses in Collagen- induced arthritis: roles of endogenous interferon-gamma and IL-4, *Arthritis Res. Ther.* 2009;11:R158.
214. Szodoray P, Nakken B, Gaal J, Jonsson R, Szegedi A, Zold E et al. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scand J Immunol* 2008; 68(3):261-9
215. Schacht, E. & J.D. Ringe. Alfacalcidol improves muscle power, muscle function and balance in elderly patients with reduced bone mass. *Rheumatol Int.* 2012;32: 207–215,
216. Slatopolsky E, Weerts C, Thielan J et al. Marked suppression of secondary hyperparathyroidism by intravenous administration of 1,25-dihydroxy-cholecalciferol in uremic patients. *J Clin Invest* 1984;74:2136–2143
217. Stockinger B. Th17 cells: an orphan with influence. *Immunol Cell Biol* 2007;85(2):83-4

218. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., and Toda M., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology*. 1995;155(3):1151–1164
219. Sebastien V, Darren P, Soumya R. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol*. 2013;9:141–153
220. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:473-88.
221. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 2007;370:1861-74.
222. Sedlak, J., Lindsay, R.H. Estimation of total, protein-bound, and non protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem* 1968;25(1):192–205
223. Seino Y, Tanaka H, Yamaoka K, Yabuuchi H. Circulating 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D levels after a single dose of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 or 1 alpha-hydroxyvitamin D3 in normal men. *Bone Miner* 1987;2:479–485
224. Stefan RJ. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int. J. Biol. Sci*. 2012;8:1237–1247
225. Sun, M., Zigman, S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal. Biochem* 1978; 90:81–89
226. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 2005;174:164–73.
227. Stockinger B., Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells, *Curr. Opin. Immunol*. 2007;19:281–286

228. Tsuji M, Fujii K, Nakano T, Nishii Y. 1 α -hydroxyvitamin D₃ inhibits type II collagen-induced arthritis in rats. *FEBS Lett* 1994
229. Takeyama, K.I. & S. Kato. The vitamin D₃ 1 α hydroxylase gene and its regulation by active vitamin D₃. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011;75: 208–213
230. Takahashi M., Nakamura K., Honda K.et al., “An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis,” *Digestive Diseases and Sciences*, 2006;51(4):677–686,
- 231.** Unger WW, Laban S, Kleijwegt FS, van der Slik AR, Roep BO. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D₃ or dexamethasone: differential role for PD-L1. *Eur J Immunol* 2009;39(11):3147-59
232. Vasanthi P., Nalini G., Rajasekhar G. Role of tumor necrosis factor- α in rheumatoid arthritis: a review, *APLAR J. Rheumatol.* 2007;10:270–274
233. Van Amelsfort J. M. R., Van Roon J. A. G, Noordegraaf M. Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4⁺,CD25⁺ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism.* 2007;56(3):732–742,
234. Vojinovic, J. & N. Damjanov. HDAC inhibition in rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Mol. Med.* 2011;7:397–403
235. Vojinovic, J. et al. Alphacalcidol (D-hormone analog) modulate inflammatory cytokine production without conversion to calcitriol. *Ann. Rheum. Dis.* 2012;1(Suppl 3.): 672
236. Vojinovic J. Vitamin D receptor agonists’ anti-inflammatory properties. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* ISSN 0077-8923

237. Valencia X, Yarboro C, Illei G, Lipsky PE. Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2007;178:2579–88.
238. Vila J., Isaacs J. D., and Anderson A. E. Tregs and autoimmunity. *Current Opinion in Hematology*, 2009;16(4):274–279
239. Vijayakumar D., Suresh K. and Manoharan S. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood of rheumatoid arthritis patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2006;21(1):104-108.
240. Wan YY, Flavell RA. TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J. Clin. Immunol.* 2008;28:647–659
241. Walker L. S. K., A. Chodos, M. Eggena, H. Dooms, and A. K. Abbas, “Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo,” *Journal of Experimental Medicine*, 2003;198(2):249–258.
242. Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT et al. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:481-94
243. Wen H and Baker J. Vitamin D, immunoregulation and Rheumatoid arthritis. *J Clin Rheum.* 2011;17:102-107.
244. Wruck CJ et al. Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the nrf2-knockout mice. *Ann Rheum Dis* 2011; May;70(5):844-50
- 245.** Wong CK, Lit LCW, Tam LS, Li EKM, Wong PTY, Lam CWK. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clin Immunol* 2008;127:385–93.
246. Yamauchi, Y. et al.. A double blind trial of alfacalcidol on patients with rheumatoid arthritis (RA). *Ryumachi* 1989;29:11–24

247. Yamazaki S, T. Iyoda, K. Tarbell et al., "Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigenprocessing dendritic cells," *Journal of Experimental Medicine*, 2003;198(2):235–247,
248. Yang TT, Sinai P, Kain SR. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells. *Anal Biochem*. 1996;241(1):103-8.
249. Yuji Y, Toshio T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. *Biomed. Res. Int*. 2014
250. Zella JB, McCary LC, DeLuca HF. Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 completely protects NOD mice from insulin- dependent diabetes mellitus. *Arch Biochem Biophys* 2003;417(1):77-80.
251. Zhang H, Shih D and Zhang X. Mechanisms underlying effects of 1,25-dihydroxyvitamin d3 on the th17 cells. *European Journal of Microbiology and Immunology* 2013;3(4):237–240
252. Zhou L., J.E. Lopes, M.M. Chong, et al., TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function, *Nature* 2008;453:236–240.
253. Zold E, Szodoray P, Nakken B. Alfacalcidol treatment restores derailed immune-regulation in patients with undifferentiated connective tissue disease. *Autoimmunity Reviews*. 2011;10:155-62
254. Zold E, Szodoray P, Kappelmayer J, Gaal J, Csathy L, Barath S, et al. Impaired regulatory T-cell homeostasis due to vitamin D deficiency in undifferentiated connective tissue disease. *Scan J Rheumatol* 2010. doi:10.3109/03009741003781951.
255. Zold E, Szodoray P, Gaal J, Kappelmayer J, Csathy L, Gyimesi E, et al. Vitamin D deficiency in undifferentiated connective tissue disease. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R123

BIOGRAFIJA

Dr Tatjana Živanović Radnić je rođena u Loznici, 9. oktobra 1978. Diplomirala je 2004. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu sa prosečnom ocenom 9,23. Tokom studija medicine bila je stipendista Fondacije za razvoj stručnog i umetničkog podmlatka, Ministarstva za sport i omladinu Republike Srbije, i Stipendista Nemačke akademske organizacije DAAD, a tokom poslediplomskih studija stipendista Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije. Magistrirala je decembra 2009. pod mentorstvom doc. dr Ivanke Markovic sa tezom "Ispitivanje citoprotektivnih efekata endogenih nukleozida na rast i preživljavanje astrocita pacova kultivisanih *in vitro*". Takođe, dobitnik je Septembarske nagrade i plakete grada Loznice „za predan i istrajan rad i stvaralački doprinos u razvoju trajnih društvenih vrednosti". Trenutno je na završnoj godini specijalizacije iz interne medicine. Svoju karijeru započela je kao saradnik u nastavi a zatim i asistent na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, gde je bila zaposlena do septembra 2010. godine. Zatim prelazi na Institut za reumatologiju gde i trenutno radi kao klinički lekar. Dr Živanović Radnić je koautor priručnika za nastavu biohemije. Tokom rada na institutu za medicinsku i kliničku biohemiju bila je angažovana na naučnom projektu (41025) pri Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije. Bila je dobitnik stipendije i učesnik na međunarodnom skupu "ICGEB theoretical Course: Mouse Genetics; Models for Human Diseases", Trst, Italija, februar 2011. U toku poslednjih pet godina, dr Živanović Radnić je publikovala nekoliko radova u časopisima indeksiranim u CC/SCI, SCI Expanded i Medline. Odabrane rezultate prezentovala je u vidu većeg broja izvoda na međunarodnim i nacionalnim skupovima. Dr Živanović Radnić je majka dvoje dece.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Tatjana Živanović Radnić

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Ispitivanje imunomodulatornih efekata alfa-kalcidola kod pacijenata sa aktivnim reumatoidnim artritisom

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.05.2016.god

T. Živanović Radnić

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Dr Tatjana Živanović Radnić

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada Ispitivanje imunomodulatornih efekata alfakalcidola kod
pacijenata sa aktivnim reumatoidnim artritismom

Mentor Doc. Dr Mirjana Šefik Bukilica

Komentor Prof. Dr Jelena Vojinović

Potpisani Tatjana Živanović Radnić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.05.2016.god

T. Živanović Radnić

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Ispitivanje imunomodulatornih efekata alfakalcidola kod pacijenata sa aktivnim reumatoidnim artritisom

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____ 15.05.2016.god

T. Živanović Radnić