

# Povezanost interferona gamma, vitamina D i estradiola u žena generativne dobi oboljelih od sistemskog eritematoznog lupusa

---

**Kokić Maleš, Višnja**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:165062>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-12**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Višnja Kokić Maleš**

**POVEZANOST INTERFERONA GAMMA, VITAMINA D I  
ESTRADIOLA U ŽENA GENERATIVNE DOBI OBOLJELIH OD  
SISTEMSKOG ERITEMATOZNOG LUPUSA**

**Doktorska disertacija**

**Mentorica:**

**Prof.dr.sc.Dušanka Martinović Kaliterna**

**U Splitu, 2018.**

Ovaj rad je izrađen u Zavodu za reumatologiju i kliničku imunologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Split pod mentorstvom prof. dr. sc. Dušanke Martinović Kaliterne.

*Ovaj rad posvećujem svojoj majci Đurđici Dovžak-Kokić*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>6</b>
1.1. Vitamin D ili hormon D? .....	9
1.2. Vitamin D i SLE .....	10
1.3. Ženski spol i SLE.....	12
1.3.1. Terapijske mogućnosti utjecaja na spolne hormone .....	15
1.4. Interferoni.....	16
1.4.1. IFN tipa I.....	17
1.4.2. IFN tipa II.....	17
1.4.3. IFN tipa III.....	17
1.5. Djelovanje IFN.....	18
1.5.1. IFN kao terapija.....	19
1.6. Interferoni i SLE .....	19
1.6.1. Interferon- $\gamma$ i SLE.....	19
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZE</b> .....	<b>21</b>
Glavni cilj istraživanja je:.....	21
Sporedni ciljevi istraživanja su:.....	21
HIPOTEZA .....	21
2.1. USTROJ ISTRAŽIVANJA.....	22
2.2. ISHOD ISTRAŽIVANJA .....	22
<b>3. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>23</b>
3.1. ISPITANICI.....	23
3.1.1. Kriteriji uključenja: .....	23
3.1.2. Kriteriji isključenja: .....	24
3.2. POSTUPCI.....	24
3.2.1. Mjerenje estradiola, vitamina D i interferona- $\gamma$ u serumu: .....	24
3.2.2. Mjerenje autoprotutijela, komponenti komplekta u serumu: .....	25
3.2.3. Statistička obrada podataka: .....	25
<b>4. ETIČKA NAČELA</b> .....	<b>26</b>
<b>5. REZULTATI</b> .....	<b>27</b>
<b>6. RASPRAVA</b> .....	<b>37</b>
6.1. Vitamin D i SLE .....	37
6.2. IFN- $\gamma$ i SLE.....	38
6.3. E <sub>2</sub> i SLE.....	39
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>40</b>
<b>8. SAŽETAK</b> .....	<b>41</b>
<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>43</b>
<b>10. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>45</b>

<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>61</b>
OSOBNİ PODACI .....	61
ŠKOLOVANJE .....	61
OBJAVLJENI RADOVI .....	63
MATERINJI JEZIK .....	65
OSTALI JEZICI .....	65

# 1. UVOD

Sistemska eritematozni lupus (SLE) prototip je autoimune bolesti koja zahvaća nekoliko organskih sustava u tijelu.<sup>1</sup> Samu bolest obilježava stvaranje patogenih autoprotutijela koja su rezultat abnormalne signalizacije između B i T limfocita.<sup>2,3</sup> Okolišni čimbenici kao i genetska podložnost pridonose razvoju SLE.<sup>4</sup> Usprkos tomu, najveći čimbenik za razvoj SLE ipak je ženski spol – oko 90% osoba koje imaju SLE su žene razne životne dobi.<sup>5</sup> Može se zaključiti da spolni hormoni doprinose nastanku ove bolesti,<sup>6</sup> iako njen mehanizam nije u potpunosti razjašnjen.<sup>7</sup> Sama bolest manifestira se različitim simptomima, čija ozbiljnost značajno varira među pojedinim bolesnicima. Isto tako, zbog velike šarolikosti simptoma SLE može nalikovati i mnogim drugim bolestima. Prema klasifikacijskim kriterijima američkog društva reumatologa (eng. *American College of Rheumatology Revised Criteria for Classification of Systemic Lupus Erythematosus*) dijagnoza je sigurna ukoliko se potvrde minimalno 4 od 11 opisanih kriterija (Tablica 1).<sup>8</sup> SLE može biti kroničan i napredujući, a obično se pojavljuje u mahovima. Aktivnost bolesti možemo izračunati prema indeksu za izračun aktivnosti bolesti (eng. *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Indeks = SLEDAI*), što se može očitati u Tablici 2. Ukoliko je zbroj simptoma veći od 3 možemo zaključiti da se radi o reaktivaciji bolesti (Tablica 3).

Ključni okidači za pojavu relapsa nisu poznati. Sunčeva svjetlost je jedan od značajnih okidača. Budući da je tijek SLE nepredvidiv, prognoza je neizvjesna. Bolest u većini slučajeva prelazi u kroničnu fazu te se razdoblja bolesti s izraženim simptomima izmjenjuju s periodima bez simptoma. Također, neki lijekovi znaju izazvati simptome SLE, pa prestanak uzimanja istih može ukloniti simptome. Blaže oblike bolesti može se kontrolirati ili liječiti nesteroidnim protuupalnim lijekovima, acetilsalicilnom kiselinom ili klorokinom.

Ozbiljne oblike bolesti potrebno je liječiti glukokortikoidima. Imunosupresivni lijekovi (azatioprin i ciklofosfamid) također se mogu koristiti u akutnom napadu SLE. Kombinacija glukokortikoida i imunosupresiva koristi se ukoliko je SLE pridružena bolest bubrega, živčanog sustava ili vaskulitis. Doza lijekova modificira se ovisno o kliničkim simptomima i laboratorijskim parametrima.

**Tablica 1. Revidirani kriteriji za klasifikaciju SLE iz 1997 godine.<sup>8</sup>**

1.	<b>Jagodični osip</b>	Fiksni eritem u razini ili iznad razine kože preko jagodične izbočine
2.	<b>Diskoidni osip</b>	Eritem iznad razine kože s adherentnim keratotičkim ljuškanjem i začepljenjem folikula; atrofične keratotičke promjene u starijim lezijama
3.	<b>Fotosenzitivnost</b>	Kožni osip nakon izlaganja suncu (u anamnezi ili prilikom pregleda liječnika)
4.	<b>Oralne ulceracije</b>	Bezbolne ulceracije u u stima ili nazofarinksu prilikom pregleda liječnika
5.	<b>Neerozivni artritis</b>	Artritis 2 ili više perifernih zglobova s bolnošću, otokom i izljevom
6.	<b>Serozitis</b>	Pleuritis – pleuritička bol u anamnezi ili klinički dokaz pleuralnog izljeva <i>ili</i> Perikarditis – dokumentiran EKG-om <i>ili</i> klinički dokaz perikardijalnog izljeva
7.	<b>Bubrežni poremećaji</b>	Perzistentna proteinurija > 0,5 grama/dan ili > od 3+ na test traci <i>ili</i> Stanični cilindri
8.	<b>Neurološki poremećaji</b>	Konvulzije (tipa grand mal) u odsustvu drugog poznatog uzroka <i>ili</i> Psihoza u odsustvu lijekova ili drugog poznatog uzroka
9.	<b>Hematološki poremećaji</b>	Hemolitička anemija s retikulocitozom <i>ili</i> Leukopenija <4,000/mm <sup>3</sup> <i>ili</i> Limfopenija <1,500/mm <sup>3</sup> <i>ili</i> Trombocitopenija <100,000/mm <sup>3</sup> u odsutnosti lijekova
10.	<b>Imunološki poremećaji</b>	Pozitivna anti-DNA antitijela <i>ili</i> Pozitivna anti-SM antitijela <i>ili</i> Pozitivna antifosfolipidna protutijela: – povišena razina IgG ili IgM antikardiolipinska protutijela, <i>ili</i> –pozitivan LAC (lupus antikoagulant) <i>ili</i> –lažno pozitivan VDRL test
11.	<b>Pozitivna protutijela antinuklearna</b>	Pozitivan test na antinuklearna protutijela bez prisutnosti lijekova koji bi ga mogli inducirati

*Prisutna 4 of 11 kriterija u bilo koje vrijeme bolesti: specifičnost dijagnoze 98%, osjetljivost 97%*

**Tablica 2. SLEDAI Indeks.<sup>9</sup>**



BODOVI	POREMEĆAJ	DEFINICIJA
8	<b>Konvulzije</b>	Isključuje metabolički poremećaj, infekcije, lijekove. Nedavna pojava.
8	<b>Psihoza</b>	Promijenjena sposobnost obavljanja normalnih aktivnosti zbog teškog poremećaja percepcije stvarnosti. Uključuje halucinacije, inkoherenciju, gubitak asocijacije, osiromaše misaoni sadržaj, nelogična razmišljanja bizarno, neorganizirano, ili katatoničko ponašanje. Isključuje uremiju i lijekove.
8	<b>Organski moždani sindrom</b>	Izmijenjena mentalna funkcija s oštećenjem orijentacije, memorije ili drugih intelektualnih funkcija. Uključuje poremećaj svijesti sa smanjenom mogućnošću usredotočivanja i nemogućnosti održavanja pažnje, plus najmanje dva od sljedećih: poremećaj percepcije, nesuvisli govor, nesanica ili pospanost tijekom dana, odnosno povećane ili smanjenje psihomotorne aktivnosti. Isključuje metaboličke, infektivne uzroke i lijekove.
8	<b>Poremećaj vida</b>	Retinalne promjene. Uključuje citoidna tijela, krvarenja mrežnice teži eksudati ili krvarenja u koroideju ili optički neuritis. Isključuje hipertenziju, infekcije, ili lijekove.
8	<b>Poremećaj kranijalnih živaca</b>	Nova pojava senzorne ili motorne neuropatije kranijalnih živaca
8	<b>Glavobolja</b>	Teška perzistentna glavobolja: može biti migrena koja ne reagira na narkotičke analgetike
8	<b>CVI</b>	Nova pojava cerebrovaskularog infarkta. Isključuje aterosklerozu.
8	<b>Vaskulitis</b>	Ulceracije, gangrena, bolni čvorovi na prstima, peringvinalne infarkcije, splinter hemoragije, ili vaskulitis dokazan biopsijom ili angiografijom.
4	<b>Artritis</b>	Više od 2 bolna zgloba s znakovima upale.
4	<b>Miozitis</b>	Slabost proksimalnih mišića s povećanim vrijednostima kreatinin kinaze/aldolaze ili promjene na EMNG ili pozitivan nalaz biopsije.
4	<b>Urinarni cilindri</b>	Hemoglobinski ili eritrocitni cilindri.
4	<b>Hematurija</b>	>5 ERITROCITA. Isključuje kamence, infekciju ili druge uzroke.
4	<b>Proteinurija</b>	>0,5 g/24h. Nova pojava ili povećanje postojeće proteinurije >0,5g/24h.
4	<b>Piurija</b>	>5 leukocita. Isključuje infekciju.
2	<b>Novi osip</b>	Pojava novog ili povrat upalnog osipa
2	<b>Alopecija</b>	Pojava nove ili povrat žarišnog ili difuznog gubitka kose
2	<b>Mukozne ulceracije</b>	Pojava novih ili povrat oralnih ili nazalnih ulceracija
2	<b>Pleuritis</b>	Pleuritički bolovi u prsištu s pleuralnim trenjem ili izljevom ili zadebljanje pleure
2	<b>Perikarditis</b>	Perikardijalni bolovi s najmanje 1 zbijanjem: trenje; izljev, ili EKG promjene.
2	<b>Nizak komplement</b>	Smanjenje CH50, C3, ili C4 ispod donje referentne granice.
2	<b>Pozitivna DNA At</b>	>25% iznad referentne razine.
1	<b>Vrućica</b>	>38°C. Isključuje infekciju.
1	<b>Trombocitopenija</b>	<100,000 T/mm <sup>3</sup> .
1	<b>Leukopenija</b>	<3,000 L/mm <sup>3</sup> . Isključuje lijekove.

**Tablica 3. Interpretacija rezultata SLEDAI indeksa**

Blagi ili umjereni relaps	Ozbiljni relaps
Promjena SLEDAI > 3 boda	Promjena SLEDAI > 12 bodova
Novi/pogoršanje diskoidnog osipa, fotosenzitivnost, vaskulitis, bolne promjene	Novi/pogoršanje SŽS-SLE
Nazofaringealne ulceracije	Vaskulitis
Pleuritis	Nefritis
Perikarditis	Miozitis
Artritis	T < 60,000
Vrućica	Anemija: Hb < 7% ili pad Hb > 3%
	Udvostručenje doze prednizona
	Prednizon > 0,5 mg/Kg/dan.
Povećanje doze prednizona, ali ne više od 0,5 mg/kg/dan	Prednizon > 0,5 mg/kg/dan
Dodatak NSAR ili hidroksiklorokina	Dodatak ciklofosfamida, azatioprina, metotreksata, hospitalizacija (SLE)

## 1.1. Vitamin D ili hormon D?

Riječ *vitamin D* donekle je neprecizan termin, jer vitamin D spada u skupinu steroidnih molekula (seko-steroida).<sup>10</sup> Vitamin D poznat je i kao kolekalciferol. Uglavnom se stvara u koži životinja, gdje se jedan od četiri prstena u prekursorskoj molekuli 7-dehidrokolesterola otvara pod utjecajem ultraljubičastog svjetla. Vitamin D (ili hormon D) stoga i nije pravi vitamin, budući da pojedinci koji se dostatno izlažu sunčevoj svjetlosti ne zahtijevaju dodatnu suplementaciju. Iako se vitamin D može pronaći u hrani, sam unos hranom često je nedostatan i iznosi svega 20% ukupne potrebe tijela.<sup>10</sup> Jetra i bubrezi su iznimno bitni radi konverzije vitamina D u aktivni oblik (vitamin D<sub>3</sub> hormon). Steroidni hormoni (poput vitamin D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub>) djeluju putem klasičnih nuklearnih vitamin D receptora (VDR), a vežu se i za specifična mjesta na plazmatskoj membrani ciljnih stanica. Važna je uloga endogenih agonista VDR u

regulaciji autoimunog odgovora te se isti koriste i kao farmakološka terapija u kliničke svrhe.<sup>11</sup> Aktivna forma vitamina D<sub>3</sub> nastaje prelaskom 25-OH D<sub>3</sub> u 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, a neaktivna u 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Ovaj način nastajanja aktivne forme vitamina D sukladan je endokrinološkom pristupu. Bubrež je izvor dva vitamin D hormona (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), a ciljne stanice posjeduju receptore za iste hormone. Mehanizmom povratne sprege ciljne stanice reagiraju na promjenu razine serumskog kalcija s posljedičnim utjecajem na razinu hormona doštitne žlijezde, paratireoidnog hormona (PTH), kao i na stimulaciju bubrežne 1 α hidroksilaze.<sup>12</sup>

## 1.2. Vitamin D i SLE

Manjak vitamina D široko je rasprostranjen i povezan je s mnogim kroničnim bolestima u što su uključene i autoimune bolesti. On nastaje zbog nedostatnog izlaganja sunčevom svjetlu, učestalog korištenja krema za sunčanje te nedostatnog unosa hranom. Osobe tamnije puti i osobe koje žive udaljeno od ekvatora osobito su sklone manjku vitamina D pa ta populacija ujedno ima i najveći rizik za razvoj SLE s težom kliničkom slikom.<sup>13</sup> Poznato je da vitamin D ima imunosupresivna svojstva te se preporuča i kao dodatna terapija kod autoimunih bolesti.<sup>13</sup> Nekoliko životinjskih modela s autoimunim bolestima pokazalo je znatno poboljšanje bolesti primjenom vitamina D.<sup>14-19</sup> Moguće da je manjak vitamina D uz naslijeđenu genetsku predispoziciju jedan od okolišnih okidača za nastanak SLE.<sup>13</sup> Manjak vitamina D može se naći u otprilike dvije trećine SLE bolesnika, među kojima jedna petina ima teški deficit vitamina D (<10 ng/ml).<sup>13</sup> U više studija je dokazana obrnuto proporcionalna korelacija serumske razine vitamina D s aktivnošću bolesti.<sup>20-22</sup> Vitamin D ima modulirajući učinak na B limfocite i proizvodnju imunoglobulina (Ig). Brojne stanice imunog sustava posjeduju receptore za vitamin D, poput monocita, makrofaga, dendritičkih stanica te aktivnih T i B limfocita. Upravo te imune stanice sadrže enzim 1α-hidroksilazu koji

je nužan za konverziju vitamina D u aktivni oblik.<sup>23</sup> Izolirane mononuklearne stanice iz periferne krvi (eng. *peripheral blood mononuclear cells* = PBMC) inkubirane s  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ili s njegovim analogom, značajno smanjuju staničnu proliferaciju kao i proizvodnju poliklonalnih i anti-DNA Ig.<sup>24</sup> Vitamin  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inducira apoptozu aktivnih B limfocita kao i regulacijskih T limfocita.<sup>25, 26</sup> Upravo potvrda VDR u stanicama imunog sustava te činjenica da neke od njih proizvode vitamin D sugerira nam mogućnost da isti ima i imunoregulatorni učinak.<sup>27</sup> Agonisti VDR primarno inhibiraju diferencijaciju dendritičkih stanica i patogenih pro-upalnih T stanica, put  $T_{\text{H}1}$  i  $T_{\text{H}17}$  stanica, a pod pogodnim okolnostima potiču  $T_{\text{H}2}$  stanični odgovor.<sup>10</sup>

Aktivni oblik vitamina D ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) potiče dvije vrste stanica: regulatorne T limfocite ( $T_{\text{reg}}$ ) i limfocite prirodne ubojice [eng. Natural Killer; (NK) stanice]. Poticanje ovih regulacijskih stanica te direktna inhibicija  $T_{\text{H}1}$  stanica je mehanizam kojim  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibira autoimunost u eksperimentalnim modelima.<sup>28</sup> Pretpostavlja se da vitamin D ima bitnu ulogu u prezentaciji B limfocitima posredovane autoimune bolesti poput SLE.<sup>25</sup> Kronična upala povezana sa SLE održava se nakupljanjem apoptotičkih ostataka u različitim tkivima. Nekoliko *in vivo* i *in vitro* istraživanja upućuju na činjenicu da je upravo nedostatno otklanjanje materijala apoptotičkih stanica u bolesnika sa SLE povezano s etiologijom i patogenezom same bolesti.<sup>29</sup> Smanjen klirens apoptotičkih stanica dovodi do nakupljanja ostatnog materijala, što aktivira klasični put komplementa i ističe C3b komponentu komplementa, što otvara mogućnost stvaranja autoprotutijela na nuklearne antigene.<sup>29,30</sup> Vitamin D je također potreban za urednu funkciju fagocita. Drži se da snižena razina vitamina D pogoduje aktivaciji autoreaktivnih B-limfocita kao i stimulaciji T-limfocita. Pojedini autoreaktivni B-limfociti prežive, proliferiraju i diferenciraju se u plazma stanice proizvodeći antinuklearna autoprotutijela, što je osnovno obilježje SLE.<sup>30</sup>

### 1.3. Ženski spol i SLE

Uloga spolnih hormona u razvoju autoimunih bolesti može se uočiti kroz veću prevalenciju SLE u žena u odnosu na muški spol (omjer 9:1).<sup>31</sup> Neki autori ovaj fenomen nazivaju „autoimunost pristrana ženskom spolu“ te smatraju da se ulogu spolnih hormona u nastanku SLE, osobito estrogena ( $E_2$ ) treba re-evaluirati.<sup>32-34</sup> Tijekom autoimunih bolesti u žena se mijenja fluktuacijom hormona tijekom trudnoće, menstrualnog ciklusa kao i primjenom oralnih kontraceptiva.<sup>35</sup> Abnormalno visoke razine estrogena, zajedno s niskom razinom testosterona, dihidrotestosterona (DHEA) i DHEA-sulfata (DHEA-S) mogu potaknuti egzacerbaciju SLE.<sup>36</sup> Muškarci s Klinefelterovim sindromom radi manjka androgenih hormona imaju veću incidenciju autoimunih bolesti vezanu za  $T_H2$  odgovor (uključujući SLE).<sup>37, 38</sup> Aromataza, enzim koji konvertira androgene u estrogene, ima pojačanu aktivnost u SLE bolesnika.<sup>36, 38</sup> Osim što SLE bolesnici imaju veći omjer estrogena/androgena, imaju i drugačiji metabolizam estrogena u odnosu na zdravu populaciju.<sup>39-41</sup> U nekih bolesnica sa SLE postoje povišene razine prolaktina koje su povezane s povišenim titrom protutijela na DNA stoga je tijekom bolesti ubrzan.<sup>42</sup> Trudnoća i post-partalni period neosporno se odražavaju na aktivnost bolesti.<sup>43</sup> U post-partalnom periodu učestale egzacerbacije bolesti mogu se pripisati povišenoj razini prolaktina.<sup>43</sup> Također visoke razine estrogena mogu objasniti pogoršanje bolesti tijekom trudnoće. Za SLE je karakterističan povišen  $T_H2$  odgovor i smanjen  $T_H1$  odgovora uz sniženje CD8 stanica, što sve skupa utječe na poremećaj humoralnog imunog odgovora.<sup>44</sup> Kod SLE bolesnika, estrogen povećava sintezu ukupnog IgG te potiče poliklonalno širenje staničnih linija koje proizvode IgG protutijela, uključujući autoreaktivne stanice koje proizvode anti-dsDNA. Testosteron inhibira proizvodnju imunoglobulina, uključujući anti-DNA protutijela.<sup>45, 46</sup> Kao što i primjena 5-dihidrotestosterona smanjuje razinu anti-DNA protutijela.<sup>47</sup> Žene oboljele od SLE u odnosu na muškarce, pokazuju veću spontanu proizvodnju protutijela, veći stupanj artritisa,

limfadenopatije, glomerulonefritisa (GN) te u konačnici i raniju smrt.<sup>46</sup> Istraživanja su pokazala da oba spola miševa genetski sklonih nastanku SLE, nakon primjene estrogena pokazuju povećani titar anti-dsDNA protutijela te GN u odnosu na kontrolnu skupinu.<sup>47, 48</sup> Također, orhidektomirani miševi u odnosu na ovarijektomirane miševe imaju raniju smrt.<sup>46</sup> Estrogeni induciraju poliklonalnu aktivaciju B limfocita, povećavajući proizvodnju IgG i IgM protutijela u PBMC oba spola.<sup>49</sup> Estrogen povećava, a testosteron smanjuje proizvodnju protutijela u PBMC bolesnika sa SLE.<sup>50</sup> E<sub>2</sub> povećava poliklonsku proizvodnju IgG, uključujući anti-dsDNA protutijela. E<sub>2</sub> također potiče aktivnost T stanica kao i proizvodnju IL-10 iz monocita. U kulturama T limfocita bolesnica sa SLE postoji povećana ekspresija kalcineurina i CD40 liganda (CD40L).<sup>51</sup> Kalcineurin je jedan od proteina T staničnog aktivacijskog puta koji povećava ekspresiju CD40L čime uzrokuje povećanu proizvodnju protutijela.<sup>51</sup> Ženke miševa sa SLE razvijaju protutijela, limfadenopatiju, artritis, imunokompleksni GN te ranije umiru u odnosu na ekvivalentne mužjake.<sup>52</sup> Primjena estrogena u SLE NZB/NZW (eng. *New Zealand black/New Zealand white*) mužjaka, uzrokuje ubrzan razvoj teškog nefritisa praćenog visokim titrom anti-DNA protutijela i posljedičnim porastom mortaliteta.<sup>53</sup> S druge strane, primjena 5 $\alpha$ -dihidrotestosteronom (DHT) smanjuje stvaranje anti-DNA protutijela te produžuje preživljavanje. E<sub>2</sub> potiče sazrijevanje prekursorskih B limfocita unutar slezene te stimulira razvoj i aktivaciju autoreaktivnih B limfocita marginalne zone. Stanice marginalne zone potiču patološki odgovor kroz stvaranje protutijela u NZB/NZW F1 sorte miševa.<sup>54, 55</sup> Učinak progesterona još nije dovoljno jasan. Poznato je da primjena depo preparata progesterona (medroksiprogesterona) kod ženki SLE miševa smanjuje mortalitet premda GN i dalje napreduje.<sup>56</sup> Naime, NZB/NZW F1 i MRL/lpr miševi spontano razvijaju protutijela koja uzrokuju GN.<sup>57</sup> Kod drugih SLE životinjskih modela, uočeno je da androgeni odgađaju, dok estrogeni ubrzavaju ekspresiju i mortalitet oboljelih od autoimunih bolesti.<sup>58</sup> U miševa, koji nisu skloni autoimunim bolestima, E<sub>2</sub>

svejedno potiče lupusu-sklon fenotip odnosno estrogeni potiču sintezu dsDNA protutijela.<sup>59</sup>  
<sup>60</sup> Utjecaj spolnih hormona je uočen i kod drugih autoimunih bolesti poput šećerne bolesti tipa 1 (NOD štakora), poliartritis (LEW/N štakora) ili autoimunog tiroiditisa (PVG/c štakora) (Ansar AS,1991).

Iako genetska podložnost i okolišni čimbenici pridonose nastanku SLE, jedan od važnih rizičnih čimbenika za razvoj SLE jest ženski spol,<sup>4,5</sup> što upućuje da spolni hormoni doprinose razlici učestalosti bolesti između spolova.<sup>6,7</sup> Estradiol je ženski spolni hormon koji se veže na estrogenske receptore (ER)<sup>61</sup> koji služe kao površina za ostale transkripcijsko regulatorne proteine.<sup>62</sup> Koaktivatori nuklearnih receptora potiču transkripciju, dok je nuklearni korepresori suprimiraju.<sup>63, 64</sup> Ligandom aktivirani ER interferiraju s p160 koaktivatorom te otvaraju kromatin u promotorskoj regiji ciljnih gena.<sup>65</sup> Receptor vitamina D je međudjelujući protein (eng. *vitamin D receptor interacting protein* = DRIP) koji dijeli podjedinicu s posredujućim kompleksom, čime aktivira RNA polimerazu II i regulatorne gene ovisne o estradiolu.<sup>66</sup> Molekularna osnova poremećene regulacije T i B limfocita u SLE bolesnika posljedica je neodgovarajuće regulacije brojnih gena.<sup>67</sup> Primjerice, u jednom istraživanju, mjereći 160 uzoraka seruma SLE bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu otkrilo se 30 abnormalno reguliranih proteina uključujući citokine, kemokine i čimbenike rasta.<sup>68</sup> Pojačana ekspresija interferona tipa I (IFN), osobito IFN- $\alpha$  upletena je u početak razvoja SLE. Lučenje IFN- $\alpha$  nakon početka virusne infekcije normalno se smanjuje već unutar par sati, ali u SLE podložnih pojedinaca razina IFN- $\alpha$  može biti održana. Razlog su geni koji kontroliraju IFN- $\alpha$ , regulirajući faktor interferona 5 (IRF5), prijenosnik signala i aktivator transkripcije (eng. *signal transducer and activator of transcription* = STAT4) te razine interferona ostaju i dalje povišene.<sup>69, 70</sup> „Interferonski potpis“ se odnosi na gene koji se potiču rad interferonskog puta koji korelira s aktivnošću SLE. Klinička ispitivanja mjesečne primjene antagoniste ER (Faslodex<sup>®</sup>) tijekom godine dana u SLE bolesnika pokazala su porast aktivnosti bolesti.<sup>71</sup>

Kalcineurin i ekspresija CD154 u istoj studiji su bili inhibirani.<sup>71</sup> Rezultati ove studije sukladni su prethodnom istraživanjima koja pokazuju da estradiol potiče kalcineurin i CD154 gene u T limfocitima SLE bolesnika.<sup>51, 72</sup> Prema dosadašnjim podacima očigledno je da su u SLE bolesnika T-limfociti pojačano osjetljivi na estradiol.<sup>7</sup>

### **1.3.1. Terapijske mogućnosti utjecaja na spolne hormone**

Utjecaj na spolne hormone u cilju održavanja žensko/muške hormonalne ravnoteže predstavlja novu mogućnost u liječenju SLE bolesnika. Intervencija uključuje korištenje anti-gonadotropnih lijekova, antagonista ER, androgena i antagonista lučenja prolaktina.<sup>73</sup> Inhibitor gonadotropina ciproteron acetat smanjuje kliničku aktivnost SLE kao i razinu estrogena u cirkulaciji.<sup>47</sup> U mišjem modelu SLE, blokiranje estrogena s tamoksifenom je smanjilo aktivnost bolesti vjerojatno kroz interferenciju s ER na limfocitima.<sup>47</sup> U ljudi sa SLE, primjena DHEA i DHEA-S ima povoljan učinak u smislu smanjenja učestalosti simptoma bolesti te redukcije glukokortikoida u terapiji.<sup>74</sup> DHEA i DHEA-S stimuliraju IL-2, inhibiraju IL-6 i IL-10 uz posljedično smanjenje titra anti-DNA protutijela.<sup>39, 40</sup> Smatra se da su Danazol<sup>®</sup> i 19-nortestosteron manje učinkoviti od gore navedenih hormona.<sup>75</sup> Bromokriptin, agonist dopamina, u mišjem modelu SLE, smanjuje aktivnost autoreaktivnih B limfocita kao i proizvodnju protutijela i prolaktina.<sup>76</sup> Prehrana bogata fitoestrogenima iz nekih biljaka zbog svoje strukture koja je slična E<sub>2</sub> predstavlja još jedan od načina promjene hormonalnog stanja u SLE bolesnika.<sup>77</sup> Na metabolizam estrogena može utjecati i enzim CYP1A1 (eng. *Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1*). Što je veća aktivnost enzima CYP1A1 manje se E<sub>2</sub> metabolizira u znatno moćniju formu (16-hidroksiestron). Indukcija enzima započinje u prisutnosti indol-3-karbinola, organske komponente koja se može naći u obitelji biljaka krstašica (*Cruciferae*) te omega-3 masnim kiselinama.<sup>77</sup> Žene oboljele od SLE imaju pojačanu ekspresiju mRNA za kalcijneurin.<sup>7</sup> Kalcijneurin je bitan dio



kaskade prijenosnih signala u T-limfocitima koji potiče transkripciju gena za sintezu citokina. Primjena antagonista kalcijneurina takrolimusa (Prograf<sup>®</sup>) kod lupus sklonih miševa rezultira redukcijom transkripcije T-limfocitnih gena čime se ublažava bolest i produžuje život.<sup>7</sup> Kalcijneurin zahtijeva kalcij kao kočimbenik, jer je bez dostatne količine kalcija funkcija manjkava. Koncentracija unutarstaničnog kalcija raste kad su T-limfociti izloženi estrogenu. Zanimljivo je da su razine unutarstaničnog kalcija više u SLE bolesnika u usporedbi sa zdravom populacijom.<sup>7, 78</sup> Također je poznato je da antihipertenziv nifedipin (dihidropiridinski antagonist kalcija) smanjuje razinu unutarstaničnog kalcija u T limfocitima čime blokira djelovanje kalcijneurina te se poboljšava tijekom SLE u miševa.

#### **1.4. Interferoni**

Interferoni su signalni proteini koje stanice otpuštaju kao odgovor na prisutnost određenih patogena poput virusa, bakterija, parazita kao i tumorskih stanica.<sup>79</sup> Osim uloge da blokira replikaciju virusa, štiteći na taj način stanice od virusne infekcije, IFN imaju brojne druge funkcije. Oni povećavaju obranu organizma aktiviranjem imunih stanica poput NK stanica i makrofaga te potiču prezentaciju antigena i ekspresiju gena glavnog kompleksa histokompatibilnosti (eng. *Major histocompatibility complex* = MHC). Pojedini parametri upale poput vrućice, boli u mišićima i „*simptoma sličnih gripi*“ posljedica su oslobađanja IFN. Interferoni su podijeljeni u tri razreda: tip I IFN, tip II IFN i tip III IFN. Dakle, IFN tipa I i tipa II su odgovorni za regulaciju i aktivaciju imunog odgovora.<sup>79</sup> Ekspresija interferona tipa I i III može biti inducirana u svim tipovima stanica nakon virusne infekcije, dok je IFN tipa II potaknut citokinima poput IL-12 i njegova ekspresija je ograničena samo na T-limfocite i NK stanice.

### **1.4.1. IFN tipa I**

U IFN tipa I ubrajamo: IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  u IFN- $\omega$ .<sup>80</sup> Većinom se IFN tipa I stvara kad ljudski organizam dođe u kontakt s virusima. IFN proizvode fibroblasti i monociti. Jednom otpušten IFN tipa I aktivira molekule koje sprečavaju virus da proizvodi i replicira svoju ribonukleinsku kiselinu (RNA) i deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA). IFN- $\alpha$  se inače koristi i u terapiji infekcije hepatitisom B i C, dok se IFN- $\beta$  koristi za liječenje multiple skleroze (MS).<sup>79</sup>

### **1.4.2. IFN tipa II**

U ovu skupinu spada IFN- $\gamma$ , poznat kao citokin koji se aktivira uz pomoć IL-12.<sup>79</sup> Interferone tipa II otpuštaju pomoćnički T limfociti (eng. *T helper cells*) tipa 1, blokirajući istovremeno proliferaciju pomoćničkih stanica tipa 2. Rezultat je inhibicija T<sub>h</sub>2 imunog odgovora i daljnja indukcija T<sub>h</sub>1 imunog odgovora, što vodi razvoju bolesti poput MS.<sup>81</sup> IFN tipa II se veže na interferon- $\gamma$  receptor (IFNGR), koji se razlikuje od receptora za IFN tipa I.<sup>79</sup>

### **1.4.3. IFN tipa III**

U treći tip interferona spada IFN- $\lambda$ 2 i IFN- $\lambda$ 3. Oni su također poznati pod nazivom IL-29, IL-28A i IL-28B.<sup>82</sup> Ovaj tip IFN djeluje putem receptorskog kompleksa koji se sastoji od interleukin 10 receptora i  $\beta$  podjedinice (IL10R) te interleukin 28 receptora i  $\alpha$  podjedinice (IFNLR1). Novija otkrića pružaju nam informacije o važnosti IFN tipa III u pojedinim oblicima virusnih infekcija.<sup>83, 84</sup>

## 1.5. Djelovanje IFN

Svi IFN dijele zajedničke učinke poput antivirusnog djelovanja i modulacije imunog odgovora. Eksperimentalno dokazano davanje IFN tipa I je inhibicija rasta tumora u životinja, ali isti učinak kod ljudi nije potvrđen.<sup>85, 86</sup> Virusom inficirane stanice otpuštaju dijelove virusa koji mogu inficirati susjedne stanice. Inficirana stanica može pripremiti susjednu stanicu protiv potencijalne infekcije virusom otpuštajući IFN. Kao odgovor na IFN, T stanice proizvode velike količine enzima protein kinaza R (PKR). Taj enzim (PKR) fosforilira protein eIF-2 (eukariotski inicijator faktora 2) u odgovoru na novu virusnu infekciju. Fosforilirani eIF-2 stvara inaktivni kompleks sa drugim proteinom, eIF2B, i na taj način smanjuje sintezu unutar stanice. Inhibicijom sinteze proteina razara se virusom inficirana stanica. I brojni drugi proteini su potaknuti IFN i poznati su pod nazivom interferon-stimulirajući geni (ISG). Oni imaju ulogu u obrani organizma od virusa a ujedno utječu i na funkciju ostalih IFN.<sup>86</sup>

Druga važna funkcija IFN je djelovanje na MHC kompleks (MHC I i MHC II). Povećana ekspresija MHC I povećava prezentaciju virusnih peptida u citotoksičnim T stanicama čime se povećava prepoznavanje i uništavanje inficiranih stanica. Povećana ekspresija MHC II, povećava prezentaciju virusnih peptida u T pomoćničkim stanicama, što utječe na otpuštanje citokina (IFN i IL) koji sudjeluju u koordinaciji i aktivnosti ostalih stanica imunološkog sustava. IFN- $\gamma$  može direktno aktivirati ostale imune stanice, poput makrofaga i NK stanica. Djelujući na specifične receptore, IFN aktiviraju prijenosnik signala i aktivator transkripcije (STAT kompleks). STAT spada u obitelj transkripcijskih faktora koji reguliraju ekspresiju određenih gena imunološkog sustava. Neki STAT su aktivirani od strane oba IFN, tipa I i II.<sup>87</sup> Aktivacija STAT započinje aktivacijom klasične Janus kinaze-STAT (JAK-STAT) signalnog puta.<sup>87</sup> U ovom putu, JAK vezana na IFN receptore, fosforilira STAT1 i STAT2. Nakon fosforilacije IFN stimulirani genetski faktor 3 kompleks (ISGF3) kojega sačinjavaju STAT1, STAT2 ulazi u staničnu jezgru. Unutar jezgre ISGF3 kompleks se

veže na specifične nukleotidne sekvence zvane IFN stimulirajući geni (ISG).<sup>87, 88</sup> Osim JAK-STAT puta, IFN može aktivirati i druge signalne putove poput CRKL, MAP kinaza i fosfatidilinozitol 3-kinazu (PI3K) puta.<sup>87</sup>

### **1.5.1. IFN kao terapija**

U liječenju MS koristi se terapija sa IFN- $\beta$ .<sup>89</sup> Ova terapija je učinkovita u smanjivanju relapsa MS kao i usporavanju progresije bolesti.<sup>89</sup> Terapija IFN koristi se najčešće u kombinaciji s kemoterapijom i zračenjem u liječenju pojedinih zloćudnih bolesti poput leukemije, limfoma i melanoma.<sup>90, 91</sup>

## **1.6. Interferoni i SLE**

SLE je prototip autoimune bolesti, obilježene mozaikom autoprotutijela i citokina.<sup>92</sup> Poznato je da citokini sudjeluju u patologiji SLE, iako etiologija i mehanizam nastanka SLE nisu posve razjašnjeni. Visoke razine interferona tipa I i II su nađene u serumu bolesnika sa SLE.<sup>93, 94</sup> Njihovi se učinci djelomično preklapaju i odražavaju na čimbenike nespecifičnog i specifičnog imunog odgovora.<sup>95</sup> S druge strane, *in vitro* je potvrđeno poremećeno stvaranje IL-12 u SLE bolesnika.<sup>96, 97</sup> Razumijevanje poremećaja u citokinskoj mreži u SLE posebno je važno radi probira budućeg liječenja.<sup>98</sup> Dokazana je povezanost ekspresije interferona u perifernoj krvi bolesnika sa SLE.<sup>99</sup> Lee i suradnici su pokazali sinergijski učinak IFN- $\gamma$  na IFN- $\alpha$  kao i značajnu ulogu E<sub>2</sub> interakcije IFN- $\alpha$  s IFN- $\gamma$  u patogenezi SLE.<sup>98</sup>

### **1.6.1. Interferon- $\gamma$ i SLE**

Iako se smatralo da tip I IFN ima važnu ulogu u autoimunom odgovoru, brojne studije su pokazale da tip II interferona, IFN- $\gamma$ , ima posebno značajnu ulogu u razvoju autoimunosti u bolesti kao što je SLE.<sup>95</sup> Ovu činjenicu podupiru i istraživanja na životinjama, koja su

pokazala kako je IFN- $\gamma$  neophodan u spontanom i induciranom modelu SLE.<sup>95</sup> Iako je ekspresija IFN- $\gamma$  u stanicama prirođenog imunog sustava brza, ekspresija istog u stečenoj imunosti zahtijeva složenu staničnu interakciju. Višestruka uloga IFN- $\gamma$  u stečenoj imunosti otvara brojne mogućnosti za terapijsku odluku u autoimunim bolestima.<sup>95</sup>

Skoro 70% gena koji reguliraju IFN- $\gamma$ , ujedno reguliraju i IFN tipa I.<sup>100</sup> Takva podudarnost se može objasniti korištenjem istih komponenti JAK-STAT signalnog puta.<sup>101, 102</sup> Preklapanje tipa I IFN sa IFN- $\gamma$  regulira značajan broj gena, od kojih mnogi pridonose djelovanju IFN- $\gamma$  u obrani domaćina od upalnih i autoimunih zbivanja.<sup>103</sup> IFN- $\gamma$  dominantno izlučuju T stanice i NK stanice,<sup>103</sup> te u nešto manjoj mjeri makrofagi, dendritičke stanice (eng. *dendritic cells* = DC) kao i B stanice.<sup>82</sup> Širok odgovor IFN- $\gamma$  posredovan je staničnom ekspresijom stotinjak gena koji reguliraju IFN- $\gamma$ .<sup>100</sup> Svoje pleitropno djelovanje IFN- $\gamma$  ima dijelom i zbog receptora koji se nalaze na različitim stanicama (IFN- $\gamma$ R).<sup>101</sup> U stečenoj imunosti IFN- $\gamma$  je produkt CD8<sup>+</sup> T stanica čime se kontrolira infekcija te CD4<sup>+</sup> T pomoćničkih stanica (T<sub>h</sub>1), koje potiču upalni odgovor, odstranjivanje unutarstaničnih patogenih produkata i stvaranje imunoglobulina (Ig) razreda IgG2a, IgG2b i IgG3.<sup>104</sup> IFN- $\gamma$  je jedan od brojnih citokina koji razlikuju Th1 od ostalih CD4<sup>+</sup> podskupina, uključujući T<sub>h</sub>2, T<sub>h</sub>17, folikularne T pomoćničke (eng. *Follicular T helper* = T<sub>fh</sub>) i T regulatorne (T<sub>reg</sub>) stanice.<sup>105</sup> Razlikovanje CD4<sup>+</sup> T stanica prema T<sub>h</sub>1 podskupini je primarno potaknuto IL-12 u odsutnosti IL-4 i transkripcijskim faktorom rasta (eng. *transcriptional growth factor* = TGF- $\beta$ ).<sup>105</sup> Posljedično tome, proizvodnja IFN- $\gamma$  je podržana brojnim čimbenicima uključujući IL-12, IL-18, IL-27 i STAT4.<sup>106-108</sup>

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**

### **Glavni cilj istraživanja je:**

- Ispitati vrijednosti IFN- $\gamma$ , 25-OH D<sub>3</sub> vitamina i E<sub>2</sub> u skupini SLE bolesnica generativne dobi s neaktivnim oblikom bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanica generativne dobi.
- Istražiti međusobne odnose IFN- $\gamma$ , 25-OH D<sub>3</sub> vitamina i E<sub>2</sub> u skupini SLE bolesnica generativne dobi s neaktivnim oblikom bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanica generativne dobi.

### **Sporedni ciljevi istraživanja su:**

- Ispitati moguću povezanost IFN- $\gamma$ , 25-OH D<sub>3</sub> vitamina i E<sub>2</sub> s razinom titra autoprotutijela [ANA (antinuklearna protutijela), anti ds DNA (protutijela na dvolančanu DNA), anti Sm (protutijela na Smithov antigen)]
- Ispitati moguću povezanost IFN- $\gamma$ , 25-OH D<sub>3</sub> vitamina i E<sub>2</sub> s vrijednostima komponenti komplementa (C3 i C4).

### **HIPOTEZA**

1. Postoji povezanost IFN- $\gamma$  i 25-OH D<sub>3</sub> vitamina odnosno u SLE bolesnica generativne dobi s neaktivnom bolesti.
2. Postoji povezanost IFN-  $\gamma$  i E<sub>2</sub> u SLE bolesnica generativne dobi s neaktivnom bolesti.
3. Postoji povezanost E<sub>2</sub> i 25-OH D<sub>3</sub> vitamina u SLE bolesnica generativne dobi s neaktivnom bolesti.

## 2.1. USTROJ ISTRAŽIVANJA

Ovo istraživanje je po pristupu kliničko, po razini i namjeni primijenjeno, po načinu dobivanja podataka opservacijsko, a po specifičnom ustroju presječno korelacijsko.

## 2.2. ISHOD ISTRAŽIVANJA

Glavni ishod je vrijednost IFN- $\gamma$  te njegova povezanost s 25-OH D<sub>3</sub> vitamin, 25-OH vitaminom D *total* i E<sub>2</sub> u serumu SLE bolesnica generativne dobi s neaktivnom bolešću.

Ulazni parametri:

- a. Razina 25-OH D<sub>3</sub> vitamina
- b. Razina E<sub>2</sub>
- c. Razina IFN- $\gamma$
- d. Indeks aktivnosti bolesti *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI)*
- e. Komponente komplementa (C3 i C4 )
- f. Specifična autoprotutijela [antinuklearna protutijela (ANA), protutijela na dvolančanu DNA (anti ds DNA) , protutijela na Smithov antigen (anti Sm)]
- g. anti-kardiolipinska autoprotutijela (aCL)

Izlazni parametri:

- a. odnosi vrijednosti E<sub>2</sub>, IFN-  $\gamma$ , 25-OH D<sub>3</sub> vitamina i 25-OH vitamina D *total* između SLE bolesnica generativne dobi i zdravih ispitanica.
- b. međusobni odnosi E<sub>2</sub>, IFN-  $\gamma$ , 25-OH D<sub>3</sub> vitamina i 25-OH vitamina D *total* između SLE bolesnica generativne dobi i zdravih ispitanica.

## 3. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

### 3.1. ISPITANICI

Ciljnu populaciju sačinjavalo je 36 bolesnica generativne dobi s dijagnozom SLE koje su u remisiji bolesti najmanje godinu dana. Dijagnozu SLE je postavio internist-reumatolog prema ACR (engl. *American College of Rheumatology*) klasifikacijskim kriterijima za SLE. Aktivnost bolesti procijenjena je upitnikom SLEDAI. SLEDAI veći od tri smatra se blagim i umjerenim oblikom relapsa SLE. Sve bolesnice koje uzimaju drugu imunosupresivnu terapiju, antikoagulantnu terapiju, nadomjestak vitamina D kao i hormonsku nadomjesnu terapiju nisu uključene u studiju. Uključene su bolesnice koje se liječe i kontroliraju u poliklinici Zavoda za reumatologiju i kliničku imunologiju, Dnevnoj bolnici i stacionaru Zavoda za reumatologiju i kliničku imunologiju KBC Split, tijekom ljetnog perioda. Kontrolnu skupinu sačinjava 37 zdravih žena odgovarajuće dobi, koje ne uzimaju nadomjesne ili druge hormonske pripravke. Sve sudionice istraživanja potpisale su informirani pristanak.

#### 3.1.1. Kriteriji uključanja:

- jasna dijagnoza SLE prema ACR kriterijima,
- generativna dob žene (od 18. godine života do menopauze pri čemu se menopauza definira kao posljednje fiziološko krvarenje iz maternice koje prosječno nastupa oko 51. godine života),
- SLE u remisiji minimalno 1 godinu,
- proteinurija manja od 150 mg na dan,
- terapija glukokortikoidima  $\leq 5$  mg/dan,
- SLEDAI  $< 2$ .



### **3.1.2. Kriteriji isključenja:**

- terapija glukokortikoidima > 5 mg/dan,
- hormonsko nadomjesno liječenje ili uzimanje drugih hormonskih pripravaka,
- uzimanje antikoagulantne terapije,
- uzimanje imunosupresivne terapije osim glukokortikoida,
- teži poremećaji menstrualnog ciklusa.

## **3.2. POSTUPCI**

Svim bolesnicima su određeni osnovni laboratorijski parametri: SE, KKS, ureja, kreatinin, AST, ALT, GGT, AF, CK, LDH, bilirubin, urin, kreatinin klirens, proteini u 24-satnom urinu, kalcij, fosfati, PTH, lupus antikoagulans (LAC), antikardiolipinska antitijela (aCL). Navedeni parametri određeni su u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Split i Radioizotopnom laboratoriju Zavoda za nuklearnu medicinu.

### **3.2.1. Mjerenje estradiola, vitamina D i interferona-gamma u serumu**

Određivanje koncentracije estradiola, 25-OH D<sub>3</sub> vitamina, 25-OH vitamina D *total* se prikupljalo izjutra natašte (između 8 i 9 sati). Krv se vadila u standardne epruvete bez aditiva (BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK). Uzorci krvi su nakon 30 minuta stajanja centrifugirani 15 minuta na 3000 okretaja/minuti čime se odvojio serum za analizu. Uzorci seruma za određivanje IFN- $\gamma$  su pohranjeni na temperaturi od -20°C do izvođenja analize. Uzorak krvi za estradiol se uzimao od 3. do 5. dana menstrualnog ciklusa. Koncentracije estradiola i 25-OH vitamina D izmjerene su komercijalno dostupnom kemiluminiscentnom imunometodom (ECLIA) na analizatoru Elecsys 2010. (Roche Diagnostics GmbH,

Sandhoferstrasse 116, DE-68305 Mannheim Germany). Koncentracija IFN- $\gamma$  se odredila enzimimunokemijskom metodom komercijalno dostupnim reagensima (Human IFN- $\gamma$  Quantikine ELISA) tvrtke R&D (R&D Systems, Inc. 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413).

### **3.2.2. Mjerenje autoprotutijela i komponenti komplekta u serumu**

Iz drugog uzorka seruma na Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku su određena specifična protutijela: ANA, anti ds DNA protutijela, anti Sm i kardiolipinska protutijela metodom višestrukog određivanja autoprotutijela FIDIS Connective 10, BioMedical Diagnostic SA, France na prilagođenom protočnom citometru Luminex 100 (Austin, USA). C3 i C4 komponente komplekta će biti određivane laserskom nefelometrijom (Behring Pro Spec nephelometer).

### **3.2.3. Statistička obrada podataka**

Podatke smo unijeli u excel tablicu. Podaci su analizirali statističkim paketom PASS software (Release 11, NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA; 2011). Ispitivane varijable: 25-OH D<sub>3</sub>, IFN- $\gamma$  i E<sub>2</sub> prikazali smo medijanom (interkvartilni raspon). Razlike 25-OH D<sub>3</sub>, IFN- $\gamma$  i E<sub>2</sub> između SLE i kontrolne skupine analizirane su Mann-Whitney U testom. . Za korelaciju između numeričkih varijabli koristili smo Spermanov koeficijenta korelacije. Cut-off vrijednosti (vrijednost praga) 25-OH D<sub>3</sub>, E<sub>2</sub> i IFN- $\gamma$  SLE ispitanica u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanica određene su ROC analizom (Youdenovim indeksom J). Povezanost serumske razine 25-OH D<sub>3</sub>, IFN- $\gamma$  i E<sub>2</sub> sa SLE je procijenjena upotrebom multinominalne binarne logističke regresije. Rezultati su interpretirani na razini značajnosti  $p < 0,05$ .

## 4. ETIČKA NAČELA

Svi postupci kojima su ispitanici u ovom istraživanju bili podvrgnuti koriste se u rutinskom dijagnostičkom postupku, praćenju i liječenju bolesnika sa sistemskom sklerozom i sistemskim eritemskim lupusom. Tijekom istraživanja poštovani su etički i bioetički principi – osobni integritet, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost u skladu s nurnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije (World Medical Association Declaration of Helsinki – 52nd WMA Annual assembly, Edinburgh, Scotland, October, 2000) te u skladu s hrvatskim zakonima (Hrvatski liječnički zbor – Kodeks medicinske etike i deontologije, Zagreb, 2002.). Dobivena je privola Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split. U istraživanje se bili uključeni samo oni ispitanici koji su prethodno potpisali informirani pristanak. Materijali će se koristiti isključivo za dobivanje rezultata i oblikovanje znanstvenog mišljenja, a neće se koristiti u svrhu materijalne dobiti.

## 5. REZULTATI

Klinički i demografske karakteristike SLE bolesnika su prikazane u Tablici 4.

**Tablica 4. Kliničke i demografske karakteristike, laboratorijski nalazi i vrijednosti 25-OH D<sub>3</sub>, IFN- $\gamma$  i E<sub>2</sub> u SLE bolesnika i kontrolnoj skupini.**

	SLE bolesnici (n=36)	Kontrolna skupina (n=37)	Medijan razlike		<i>p</i>
			Aps.	Rel.	
<b>Dob</b> (godine)	40 (33-43)	39 (32-42)			
<b>Trajanje bolesti</b> (godine)	10 (8-13)	N/A			
<b>Kortikosteroidi</b> (mg)	2,3 (0,00-3,63)	N/A			
<b>25-OH D<sub>3</sub></b> (ng/ml)	16,5 (12,7-20,9)	22,9 (18,1-26,4)	-6,4	28%	0,001
<b>IFN-<math>\gamma</math></b> (pg/ml)	2,4 (1,0-5,7)	1,0 (1,0-1,0)	1,4		<0,001
<b>E<sub>2</sub></b> (nmol/L)	0,53 (0,36-0,61)	0,33 (0,29-0,40)	0,20	61%	<0,001
<b>PTH</b> (pg/ml)	13,9 (12,4-16,5)	15,1 (13,1-16,9)	-1,2	8%	0,275
<b>ANA</b> (U/ml), n (%)	26 (72,2)	N/A			
<b>Anti-dsDNA</b> (IU/ml)	44,5 (7,3-245,3)	N/A			
<b>Anti-dsDNA &gt; 40 IU/ml</b> , n (%)	19 (52,8)	N/A			
<b>Anti-Sm</b> (AU/ml)	44,5 (7,3-245,3)	N/A			
<b>Anti-Sm &gt; 40 AU/ml</b> , n (%)	2 (5,6)	N/A			
<b>C<sub>3</sub></b> (g/L)	0,84 (0,73-0,95)	N/A			
<b>C<sub>4</sub></b> (g/L)	0,13 (0,09-0,20)	N/A			

1. Podaci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)
2. **25-OH D<sub>3</sub>** = 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub>; **IFN- $\gamma$**  = interferon gama; **E<sub>2</sub>** = estradiol; **PTH** = paratiroidni hormon; **ANA** = antinuklearna protutijela; **anti-dsDNA** = anti-double-stranded DNA; **anti-Sm** = anti-Smith; **C<sub>3</sub>** i **C<sub>4</sub>** = komponente komplementa; **Aps.** = absolute razlika; **Rel.** = Aps.\*100/ vrijednost“kontrolna skupina“; **p** = Mann-Whitney U test asimptotski dvostruki statistički značaj; **N/A** = (eng. not applicable); nije primjenjivo

Medijan 25-OH D<sub>3</sub> bio je za 6,4 ng/ml niži u SLE bolesnica u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p=0,001$ ). Vrijednost medijana IFN- $\gamma$  ( $p<0,001$ ) bila je viša za 2,4 pg/ml a E<sub>2</sub> ( $p<0,001$ ) za 0,20 nmol/L u SLE ispitanica u odnosu na kontrolnu skupinu. Radi daljnje analize ispitanice smo dodatno podijelili u dvije skupine obzirom na 25-OH D<sub>3</sub> ( $\leq 20$  ng/ml ;  $>20$  ng/ml).<sup>109</sup> Vrijednosti IFN- $\gamma$ , E<sub>2</sub>, i PTH ( $p>0,05$ ) se nisu statistički značajno razlikovale u odnosu na razine 25-OH D<sub>3</sub> ( $\leq 20$  ng/ml;  $>20$  ng/ml) u kontrolnoj skupini ispitanica stoga se kontrolna skupina u daljnjoj analizi nije dijelila na podskupine prema razinama 25-OH D<sub>3</sub> ( $\leq 20$  ng/ml;  $>20$  ng/ml). Uspoređivali smo tri skupine: kontrolna skupina, SLE ispitanice s 25-OH D<sub>3</sub> $\leq 20$  ng/ml i SLE ispitanice s 25-OH D<sub>3</sub> $>20$  ng/ml. Vrijednosti IFN- $\gamma$  su se statistički značajno razlikovale između tri ispitivane skupine ( $p<0,001$ ). Vrijednost medijana IFN- $\gamma$  u SLE bolesnica sa 25-OH D<sub>3</sub> $\leq 20$  ng/ml bila je za 1,5 pg/ml viša u odnosu na SLE ispitanice s 25-OH D<sub>3</sub> $>20$  ng/ml i u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p=0,008$ ) (Tablica 5). E<sub>2</sub> se statistički značajno razlikovao između tri promatrane skupine ( $p=0,001$ ). Medijan E<sub>2</sub> u SLE ispitanica s 25-OH D<sub>3</sub> $>20$  ng/ml bio je za 0,24 nmol/L veći ( $p=0,009$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. Dok je medijan E<sub>2</sub> u SLE ispitanica s 25-OH D<sub>3</sub> $\leq 20$  ng/ml bio za 0,14 nmol/L veći ( $p=0,035$ ) nego u kontrolnoj skupini. Vrijednosti PTH se nisu statistički značajno razlikovale između ispitivanih skupina (Tablica 5.).

Napravili smo ROC analizu IFN- $\gamma$  (Slika 1a), E<sub>2</sub> (Slika 1b) i 25-OH D<sub>3</sub> (Slika 1c) za SLE u odnosu na kontrolnu skupinu i dobili smo sljedeće rezultate (Tablica 6). Ispitanice smo podijelili temeljem dobivenih „vrijednosti praga“ na one kod kojih je IFN- $\gamma \leq 1.3$  pg/ml i IFN- $\gamma > 1.3$  pg/mL; 25-OH D<sub>3</sub> $\leq 20$  ng/ml i 25-OH D<sub>3</sub> $>20$  ng/ml te E<sub>2</sub> $\leq 0.345$  nmol/L, i E<sub>2</sub> $>0.345$  nmol/L (Tablica 7).

Da bi utvrdili povezanost ispitivanih varijabli sa SLE napravili smo multinominalnu regresijsku analizu (Tablica 7), koja je pokazala međusobno nezavisnu povezanost IFN- $\gamma$ , 25-

OH D<sub>3</sub> i E<sub>2</sub> sa SLE u bolesnica u remisiji. U odnosu na kontrolnu skupinu u tih bolesnica povećani su izgledi da su plazmatske koncentracije navedenih tvari u slijedećim vrijednostima

-za IFN- $\gamma$ >1.3 pg/ml izgledi su povećani 10 puta;

-za 25-OH D<sub>3</sub>≤20 ng/ml izgledi su povećani 7.6 puta;

-za E<sub>2</sub>>0.345 nmol/L izgledi su povećani 5,4 puta.

**Tablica 5. Raspodjela ispitanica (SLE bolesnice i kontrolna skupina) u odnosu na koncentraciju 25 OH-D<sub>3</sub>**

	SLE ispitanice		Kontrolna skupina		<i>p</i> *
	25 OH-D <sub>3</sub>	25 OH-D <sub>3</sub>	25 OH-D <sub>3</sub>	25 OH-D <sub>3</sub>	
	> 20 ng/ml (n=9)	≤ 20 ng/ml (n=27)	> 20 ng/ml (n=26)	≤ 20 ng/ml (n=11)	
<b>IFN-<math>\gamma</math></b> (pg/ml)	1,0 (1,0-4,7)	2,5 (1,0-6,8)	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)	<0,001
<b>E<sub>2</sub></b> (nmol/L)	0,58 (0,42-0,63)	0,48 (0,35-0,59)	0,33 (0,29-0,38)	0,34 (0,29-0,55)	0,001
<b>PTH</b> (pg/ml)	13,6 (12,9-15,4)	14,3 (12,2-17,2)	15,1 (12,8-16,4)	15,0 (13,2-20,2)	0,664

Podaci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon).

\**p* se odnosi na usporedbu triju skupina : kontrolne skupine, SLE ispitanice s 25 OH-D<sub>3</sub>>20 ng/ml i 25 OH-D<sub>3</sub>≤20 ng/ml

IFN- $\gamma$  = interferon gamma; E<sub>2</sub>: estradiol; PTH = paratiroidni hormon; *p* = Kruskal-Wallis test

**Tablica 6. Rezultati ROC analize za SLE u odnosu na kontrolnu skupinu.**

	<b>Vrijednost praga (Cut off)</b>	<b>Površina ispod ROC krivulje (AUC)</b>	<b>95% CI</b>	<b><i>p</i></b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	1.3 pg/ml	0,77	(0.65-0.86)	<0.001
<b>25-OH D<sub>3</sub></b>	20 mg/ml	0,73	(0,61-0,82)	<0.001
<b>E<sub>2</sub></b>	0.345 nmol/l	0.75	(0.64-0.85)	<0.001

AUC = Area under curve; 95% CI = 95% interval pouzdanosti; IFN- $\gamma$ = interferon gama; 25-OH D<sub>3</sub>= 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub>; E<sub>2</sub>= estradiol.

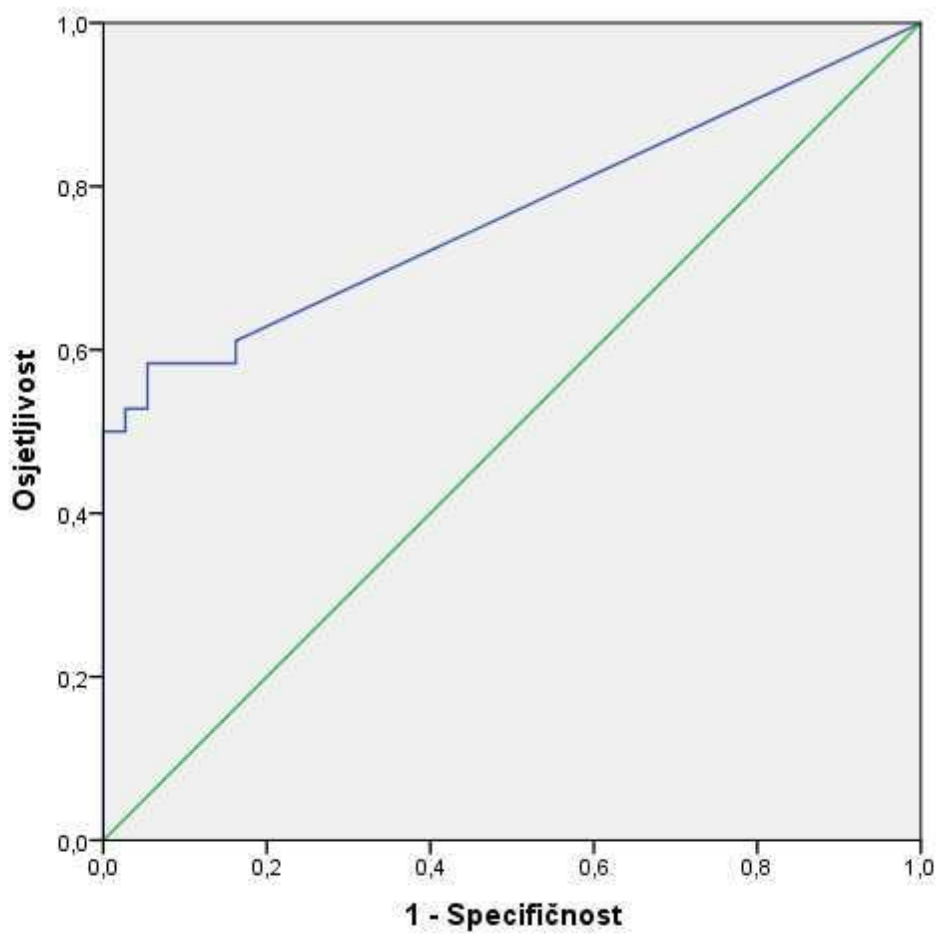
**Tablica 7. Raspodjela ispitanica (SLE bolesnice i kontrolna skupina) prema vrijednostima praga ispitivanih varijabli (IFN- $\gamma$ , 25-OH D<sub>3</sub> i E<sub>2</sub>); rezultati multinominalne binarne logističke regresije**

	SLE bolesnice (n=36)	Kontrolna skupina (n=37)	OR (95% CI)	<i>P</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>				
> 1.3 pg/ml	21 (58.3)	3 (8.1)	9.91 (2.15-45.69)	0.003
≤ 1.3 pg/ml	15 (41.7)	34 (91.9)	1	
<b>25-OH D<sub>3</sub></b>				
≤ 20 ng/ml	27 (75.0)	11 (29.7)	7.56 (2.05-27.86)	0.002
> 20 ng/ml	9 (25.0)	26 (70.3)	1	
<b>E<sub>2</sub></b>				
> 0.345 nmol/L	30 (83.3)	15 (40.5)	5.39 (1.39-20.87)	0.015
≤ 0.345 nmol/L	6 (16.7)	22 (59.5)	1	

Podatci su prikazani kao broj (%) ispitanica

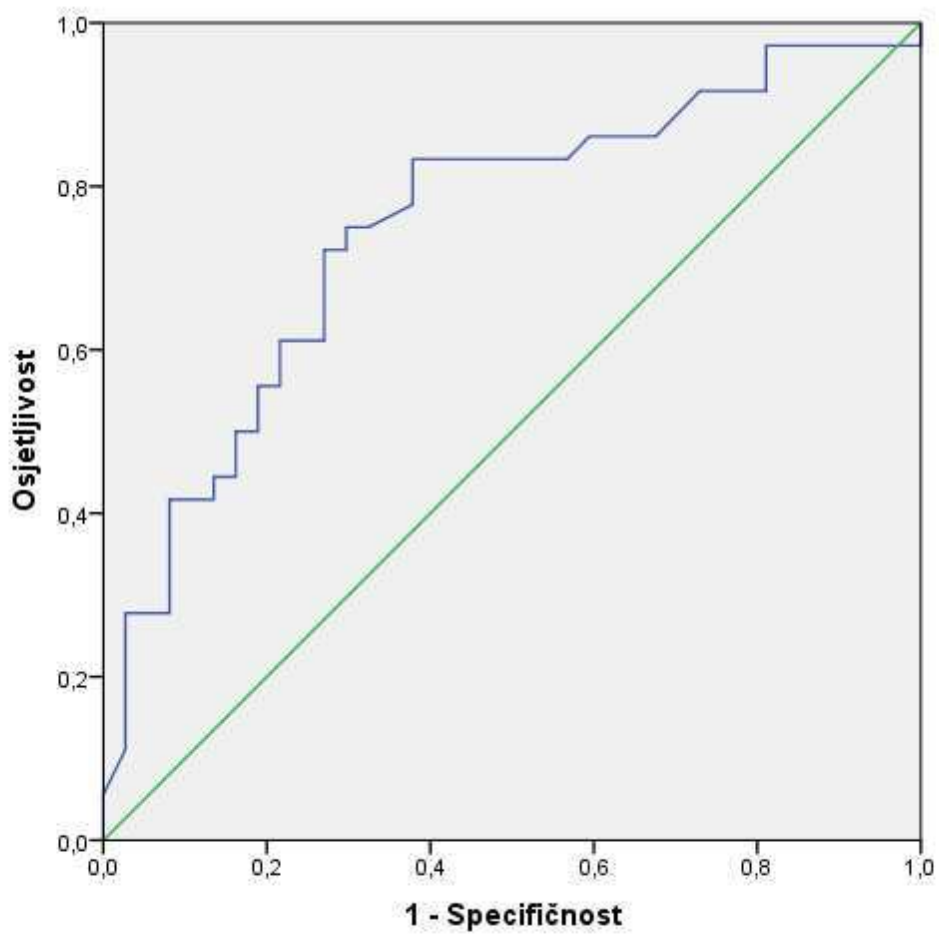
OR = Odds ratio; 95% CI = 95% interval pouzdanosti omjera izgleda; IFN- $\gamma$  = interferon gama; 25-OH D<sub>3</sub> = 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub>; E<sub>2</sub> = estradiol.





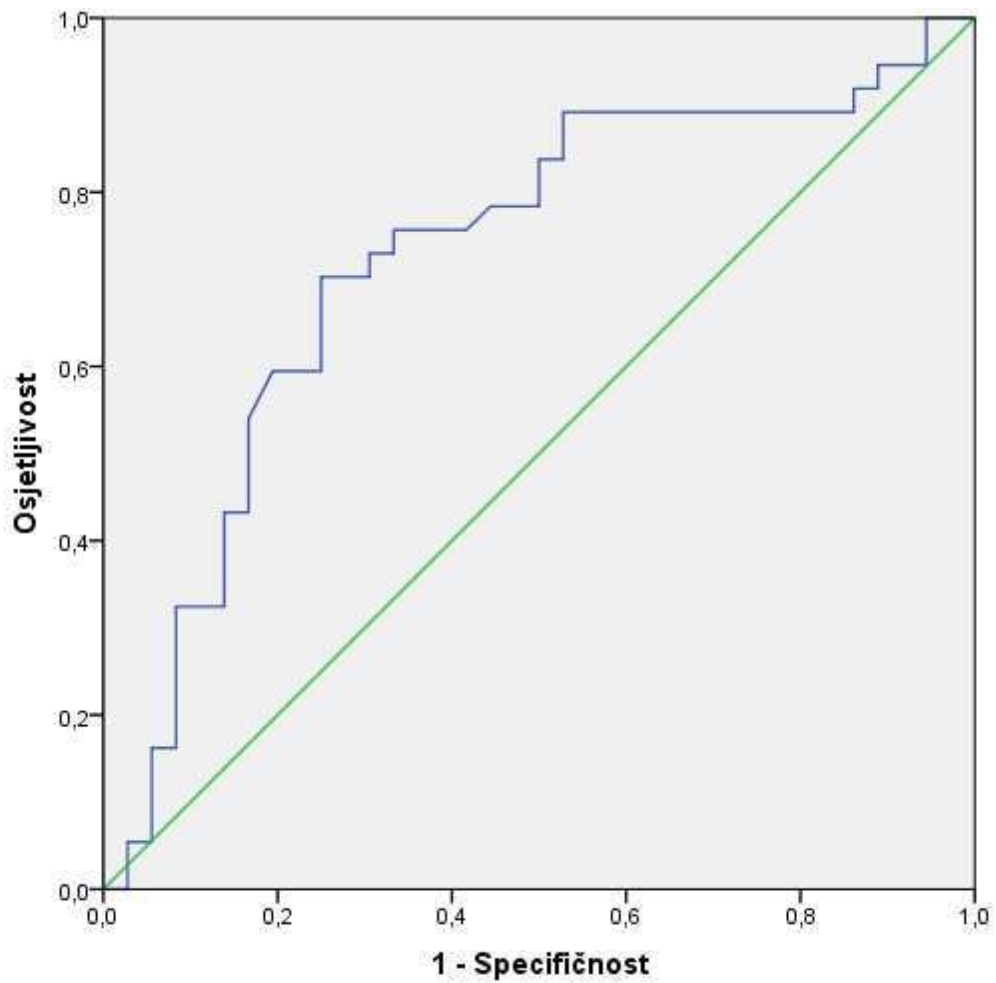
**Slika 1a)** ROC\* krivulja IFN- $\gamma$  za SLE u odnosu na kontrolnu skupinu. AUC\* = 0.77; 95% CI 0.65-0.86;  $p < 0.001$ ; Youden index  $J = 1.3$ .

\*ROC: receiver operating characteristic; IFN- $\gamma$ : interferon-gamma; AUC: area under curve.



**Slika 1b)** ROC\* krivulja E<sub>2</sub> za SLE u odnosu na kontrolnu skupinu. AUC\* = 0.75; 95% CI 0.64-0.85;  $p < 0.001$ ; Youden index J = 0.345.

\*ROC: receiver operating characteristic; E<sub>2</sub>: estradiol; AUC: area under curve.



**Slika 1c)** ROC\* krivulja 25-OH D<sub>3</sub> za SLE u odnosu na kontrolnu skupinu. AUC\* = 0.73; 95% CI 0.61-0.82;  $p < 0.001$ ; Youden index J = 19.9 za SLE u odnosu na kontrolnu skupinu.

\*ROC: receiver operating characteristic; 25-OH D<sub>3</sub>:25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub>; AUC: area under curve.

U SLE bolesnica korelacija 25-OH D<sub>3</sub> i E<sub>2</sub> je bila pozitivna, ali ne i statistički značajna, jer je bila na rubu statističke značajnosti (Spearman's  $\rho=0,31$ ;  $p<0,065$ ). Nije pronađena korelacija IFN- $\gamma$  sa E<sub>2</sub> kao ni IFN- $\gamma$  s 25-OH D<sub>3</sub> u SLE ispitanica (Tablice 8). Korelacija između E<sub>2</sub> i IFN- $\gamma$  je bila pozitivna i statistički značajna (Spearman's  $\rho=0,25$ ;  $p<0,05$ ) u svih ispitanika.

**Tablica 8. Korelacija vrijednosti 25-OH D<sub>3</sub>, IFN- $\gamma$ , E<sub>2</sub> u SLE bolesnica i kontrolnoj skupini**

	Cijeli uzorak (n=73)				SLE bolesnice (n=36)				Kontrolna skupina (n=37)			
	25-OH D <sub>3</sub>	Total vit D	IFN- $\gamma$	E <sub>2</sub>	25-OH D <sub>3</sub>	Total vit D	IFN- $\gamma$	E <sub>2</sub>	25-OH D <sub>3</sub>	Total vit D	IFN- $\gamma$	E <sub>2</sub>
<b>25-OH D<sub>3</sub></b>	1.00				1.00				1.00			
<b>Total vitamin D</b>	0.90**	1.00			0.89**	1.00			0.91**	1.00		
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>-0.22*</b>	-0.10	1.00		0.04	0.01	1.00		-0.02	0.09	1.00	
<b>E<sub>2</sub></b>	-0.12	-0.06	0.25**	1.00	<b>0.31*</b>	0.29	0.04	1.00	-0.20	-0.22	-0.17	1.00

Podatci su prikazani kao Spearman rho ( $\rho$ ) koeficijent of korelacije

25-OH D<sub>3</sub> = 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub>; Total vit D = ukupna koncentracija vitamina D; IFN- $\gamma$  = interferon gama; E<sub>2</sub> = estradiol; PTH = paratiroidni hormon; OR = odds ratio, univarijatna binarna logistička regresija; referentna vrijednost je bila  $\leq 20$  ng/ml; 95% CI = 95% interval pouzdanosti za OR

\* Statistička značajnost  $p<0.1$

\*\* Statistička značajnost  $p<0.05$

Vitamin D (25-OH D<sub>3</sub>) je pozitivno korelirao s anti-Sm ( $p<0,05$ ) kao i s anti-dsDNA ( $p<0,01$ ) protutijelima. Estradiol je pozitivno korelirao s anti-dsDNA autoprotutijelima ( $p<0,05$ ), ali ne i s anti-Sm protutijelima u SLE bolesnica. Interferon- $\gamma$  nije korelirao s anti-Sm kao i anti-dsDNA protutijelima u SLE ispitanica. Titar anti-dsDNA protutijela je

negativno korelirao s C3 i C4 komponentama komplementa ( $p < 0,01$  i  $p < 0,05$ ). Korelacija IFN- $\gamma$ , 25-OH D<sub>3</sub> i E<sub>2</sub> s razinom titra autoprotutijela (ANA, anti ds DNA i anti Sm) kao i vrijednostima komponenti komplementa (C3 i C4) je prikazana u Tablici 9.

**Tablica 9. Korelacija vrijednosti 25-OH D<sub>3</sub>, vitamina D total, IFN- $\gamma$ , E<sub>2</sub>, C3, C4, ANA, Anti-Sm i Anti-ds DNA u SLE bolesnica**

	25-OH D <sub>3</sub>	Ukupni Vit. D	IFN- $\gamma$	E <sub>2</sub>	C3	C4	ANA	Anti-Sm	Anti-dsDNA
<b>25-OH D<sub>3</sub></b>	1,00								
<b>Vitamin D ukupni</b>	0,90*	1,00							
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	0,04	0,01	1,00						
<b>E<sub>2</sub></b>	0,31	0,29	0,04	1,00					
<b>C<sub>3</sub></b>	0,07	0,05	0,10	-0,02	1,00				
<b>C<sub>4</sub></b>	0,09	0,06	-0,11	-0,06	<b>0,82**</b>	1,00			
<b>ANA</b>	0,17	0,25	0,16	0,05	-0,16	-0,31	1,00		
<b>Anti-Sm</b>	<b>0,46**</b>	<b>0,61**</b>	0,27	0,19	-0,20	-0,21	<b>0,37*</b>	1,00	
<b>Anti-dsDNA</b>	<b>0,38*</b>	<b>0,46**</b>	0,00	<b>0,36*</b>	<b>-0,43**</b>	<b>-0,42*</b>	<b>0,66**</b>	<b>0,50*</b>	1,00

Podaci su prikazani kao Spearman's rho ( $\rho$ ) koeficijent korelacije

25-OH D<sub>3</sub> = 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub>; IFN- $\gamma$  = interferon gamma; E<sub>2</sub> = estradiol;

C<sub>3</sub> i C<sub>4</sub> = komponente komplementa; ANA = antinuklearna autoprotutijela;

anti-Sm = anti-Smith autoprotutijela; anti-dsDNA = anti-double-stranded DNA autoprotutijela.

\* Statistička značajnost od  $p < 0,05$

\*\* Statistička značajnost od  $p < 0,01$

## 6. RASPRAVA

### 6.1. Vitamin D i SLE

Cilj istraživanja bio je ispitati razine i moguću povezanost 25-OH D<sub>3</sub> vitamina, E<sub>2</sub> i IFN- $\gamma$  u žena s neaktivnim SLE. Poznato je da je vitamin D bitan hormon s imunomodulirajućim sposobnostima koji ima važnu ulogu u biološkim i biokemijskim putovima.<sup>110-112</sup> Činjenica je da kod većina bolesnika sa SLE postoji smanjene razine vitamina D u usporedbi sa zdravom populacijom.<sup>113</sup> Kako izlaganje UV zrakama može potaknuti simptome SLE, preporuča se SLE bolesnicima svakodnevno korištenje zaštitnih mjera od sunca.<sup>114, 115</sup> Deficit vitamina D može biti prisutan i u općoj populaciji, vjerojatno zbog smanjenog izlaganja suncu, učestalog korištenja zaštitnih krema te nerijetko i smanjenog unosa vitamina D.<sup>22</sup> Interes za povezanost vitamina D i SLE pojavila se tijekom zadnjeg desetljeća 20-tog stoljeća, kada se vitamin D povezao sa smanjenjem koštane mase.<sup>116</sup> Smanjeno izlaganje suncu jedan je od razloga manjka vitamina D u SLE bolesnika.<sup>117</sup> Brojne studije ističu povezanost manjka vitamina D i aktivnosti lususne bolesti.<sup>13, 113, 118</sup> Kako u našem radu nije bilo statistički značajne razlike između 25-OH D<sub>3</sub> i 25-OH vitamina D total, kojeg bi sačinjavao zbroj vitamina D<sub>3</sub> (kolekalciferola) i vitamina D<sub>2</sub> (ergokalciferola), koristili smo vrijednosti 25-OH D<sub>3</sub>. Nekoliko studija upućuje na pozitivnu korelaciju između aktivnog oblika SLE i manjka vitamina D.<sup>20, 119, 120</sup> Studija Amitala i suradnika<sup>20</sup> potvrdila je postojanje negativne korelacije između serumske koncentracije vitamina D i aktivnosti SLE. Takva korelacija upućuje na mogućí protektivni učinak vitamina D na tijek SLE. U studiji Moka i suradnika,<sup>120</sup> 25-hidroksivitamin D<sub>3</sub> negativno je povezan s kliničkom aktivnosti bolesti. Petri sa suradnicima je također objavila postojanje negativne korelacije između suplementacije vitamina D i aktivnosti bolesti.<sup>121</sup> S druge strane, u randomiziranoj kliničkoj studiji Karimzadeha i suradnika,<sup>122</sup> suplementacija vitamina D nije utjecala na promjenu aktivnosti

bolesti, što je objašnjeno nepoznatim okolišnim ili biološkim čimbenicima koji bi eventualno mogli utjecati na aktivnost SLE. Usprkos tome što su SLE bolesnice u našoj studiji imale duži vremenski period neaktivnu bolesti, srednja vrijednost vitamina D je bila niža u odnosu na kontrolnu skupinu. Da bi utvrdili povezanost vitamina D sa SLE napravili smo multinominalnu regresijsku analizu koja je pokazala da su izgledi da je u bolesnica sa SLE u remisiji plazmatska koncentracija  $25\text{-OH D}_3 \leq 20$  ng/ml veći 7,6 puta u odnosu na kontrolnu (zdravu) skupinu. Ovaj rezultat može sugerirati blagotvoran učinak vitamina D u odnosu na bolest.  $25\text{-OH D}_3$  je pozitivno korelirao s anti-Sm kao i s anti-dsDNA autoprotutijelima, što je u kontradikciji s dosadašnjim izvješćima o blagotvornom djelovanju vitamina D na tijek lupusne bolesti. Dolazi u obzir ovdje razmatrati vitamin D kao hormon sličnog djelovanja kao  $E_2$ .

## 6.2. IFN- $\gamma$ i SLE

Sposobnost IFN- $\gamma$  da potiče B stanice i produkciju autoprotutijela uz aktivaciju IgG Fc receptora i komplementa može također pridonijeti težini bolesti.<sup>104</sup> Naši rezultati pokazuju višu koncentraciju IFN- $\gamma$  u SLE bolesnica s neaktivnom bolesti u usporedbi s kontrolnom skupinom. Analizirajući podskupine, u SLE bolesnica s manjkom vitamina D ( $25\text{-OH D}_3 \leq 20$  ng/ml) pronađena je 150% viša razina IFN- $\gamma$  u odnosu na kontrolnu skupinu. Izgled da je u bolesnica sa SLE u remisiji plazmatska koncentracija IFN- $\gamma > 1,3$  pg/ml veći su 10 puta u odnosu na kontrolnu (zdravu) skupinu. Nije uočena korelacija IFN- $\gamma$  sa autoprotutijelima, što se može objasniti činjenicom da su bolesnice duži vremenski period imale neaktivnu bolest. Složena uloga IFN- $\gamma$  u SLE bolesnika naglašena je kontradiktornim rezultatima u kliničkim studijama koje su istraživale postojanje korelacije između serumske razine IFN- $\gamma$  i aktivnosti bolesti kao i korelaciju između ekspresije IFN- $\gamma$  i težine SLE nefritisa.<sup>123, 124</sup> Uloga monoklonskih protutijela na IFN- $\gamma$  u cilju liječenja SLE još uvijek je u fazi istraživanja.<sup>125</sup>

### 6.3. E<sub>2</sub> i SLE

Poznato je da su estrogenski hormoni s imuno-modulirajućim djelovanjem.<sup>126</sup> 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) može promicati urođenu imunost potičući CD11+ DC IFN-γ proizvodnju.<sup>127</sup> Rastući broj literaturnih podataka podržava tezu o izravnom učinku E<sub>2</sub> na proizvodnju IgG, kao i stvaranje protutijela. Stoga se smatra da hiperestrogenemija potiče B stanični odgovor.<sup>128, 129</sup> Međutim, postoje različita mišljenja o utjecaju aktivnosti bolesti na funkciju jajnika. Pojedina istraživanja ističu vezu između aktivnosti autoimunih bolesti i neredovitog menstrualnog ciklusa, dok u drugim istraživanjima ta veza nije potvrđena.<sup>130-132</sup> Izgledi da je u bolesnica sa SLE u remisiji plazmatska koncentracija E<sub>2</sub>>0,345 nmol/L veći su 5,4 puta u odnosu na kontrolnu (zdravu) skupinu. Također smo potvrdili pozitivnu korelaciju E<sub>2</sub> sa anti-dsDNA autoprotutijelima, što je sukladno dosadašnjim saznanjima o utjecaju estrogena na produkciju autoprotutijela.<sup>59</sup>

Budući da vitamin D i estrogen djeluju preko receptora u imunološkim stanicama,<sup>133, 134</sup> posebice B-limfocitima, bitnim za patogenezu lupusne bolesti, moguće natjecanje za receptorsko mjesto te izmijenjen post-receptorski odgovor mogli bi objasniti ova događanja. Zanimljivo je da se djelovanje vitamin D i estradiola isprepliće. Pojedine studije pokazale su da aktivan oblik vitamina D kalcitriol regulira ekspresiju aromataze.<sup>135</sup> S druge strane, liječenje estrogenom rezultira porastom razine vezanog i slobodnog kalcitriola kao i vitamina D vezanog na protein.<sup>136, 137</sup> Utjecaj nadomjesne terapije vitamina D na razinu spolnih hormona proučavan je u mladih žena. Uočeno je sniženja koncentracije progesterona te u manjem opsegu i estrogena tijekom 4 tjedna primjene vitamina D.<sup>138</sup> Daljnja istraživanja uz korištenje većih doza vitamina D u SLE bolesnica s aktivnim i neaktivnim oblikom bolesti vjerojatno bi proširila naše spoznaje.<sup>139</sup>



## 7. ZAKLJUČAK

Naše istraživanje potvrdilo je poremećaj razina vitamina D, estrogena i IFN- $\gamma$  kod SLE bolesnica u odnosu na zdrave ispitanice. Iako su SLE bolesnice imale duži vremenski period neaktivnu bolest, srednja vrijednost vitamina D bila je niža u odnosu na kontrolnu skupinu. Izgledi da je u bolesnica sa SLE u remisiji plazmatska koncentracija 25-OH D<sub>3</sub>  $\leq$  20 ng/ml veći su 7,6 puta u odnosu na kontrolnu (zdravu)skupinu.

Podaci o utjecaju IFN- $\gamma$  na tijek SLE do sada su u literaturi kontradiktorni. Našim istraživanjem potvrdili smo da je u SLE bolesnica s manjkom vitamina D (25-OH D<sub>3</sub>  $\leq$  20 ng/ml) IFN- $\gamma$  bio 150% viši u odnosu na kontrolnu skupinu. Također izgledi da je u bolesnica sa SLE u remisiji plazmatska koncentracija IFN- $\gamma$   $\leq$  1,3 pg/ml veći su 10 puta u odnosu na kontrolnu (zdravu) skupinu, što ističe važnost ovog citokina u lopusnoj bolesti.

Koncentracija E<sub>2</sub> je bila viša u svih SLE bolesnica u odnosu na kontrolnu grupu, što je sukladno dosadašnjim spoznajama o utjecaju estrogena na produkciju autoprotutijela i razvoj autoimune bolesti. Izgledi da je u bolesnica sa SLE u remisiji plazmatska koncentracija E<sub>2</sub>  $>$  0,345 nmol/L veći su 5,4 puta u odnosu na kontrolnu (zdravu)skupinu. E<sub>2</sub> je pozitivno korelirao s dsDNA protutijelima. Zanimljivo je da je vitamin D pozitivno korelirao anti-Sm i anti-dsDNA što bi mogli objasniti činjenicom da vitamin D i E<sub>2</sub> imaju receptore na istim imunološkim stanicama, te je moguće križno djelovanje. Uvažavajući ograničenja istraživanja poput relativno malog broja ispitanika te presječnog dizajna istraživanja, držimo da smo rasvijetlili dio odnosa IFN- $\gamma$ , E<sub>2</sub> i vitamina D za tijek lopusne bolest.

## 8. SAŽETAK

**Uvod:** SLE, kao i produkcija autoprotutijela, neosporno su povezani sa ženskim spolnim hormonima, osobito E<sub>2</sub>. Povoljan učinak vitamina D na tijek autoimunih bolesti potvrđen je kroz brojne studije, dok se utjecaj upalnih citokina, osobito interferona, još uvijek ispituje.

**Cilj:** Ispitati serumske razine 25-hidroksi vitamina D<sub>3</sub>, estradiola i interferona-gama kao i moguću povezanost navedenih parametara u SLE bolesnica generativne dobi s neaktivnim oblikom bolesti.

**Metode:** U studiju je uključeno 36 SLE bolesnica kao i 37 zdravih ispitanica. Serumske koncentracije 25-OH D<sub>3</sub>, E<sub>2</sub> i IFN- $\gamma$  određene su metodom radioimunotesta (engl. *radiomunoassay*, RIA) i enzimskog imunotesta (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA).

**Rezultati:** Koncentracija 25-OH D<sub>3</sub> bila je niža u SLE u odnosu na kontrolne ispitanice ( $p=0,001$ ), dok je koncentracija E<sub>2</sub> bila viša u SLE u usporedbi s kontrolnom grupom ( $p<0,001$ ). U vitamin D deficijentnih SLE bolesnica (25-OH D<sub>3</sub> $\leq$ 20 ng/ml), IFN- $\gamma$  je bio 150% viši u odnosu na SLE bolesnice, koje su imale 25-OH D<sub>3</sub> $>$ 20 ng/ml, kao i u odnosu na kontrolne ispitanice ( $p=0,008$ ). Koncentracija E<sub>2</sub> bila je viša u svih SLE bolesnica uspoređujući s kontrolnom grupom, neovisno o vrijednostima vitamina D ( $p=0,009$  i  $p=0,035$ ). Na cijelom uzorku dokazana je pozitivna korelacija E<sub>2</sub> i IFN- $\gamma$  ( $p=0,027$  i  $p<0,05$ ).

Vitamin 25-OH D<sub>3</sub> je pozitivno korelirao s dsDNA i Sm protutijelima, dok je E<sub>2</sub> je pozitivno korelirao smo s dsDNA protutijelima.

**Zaključak:** Razine estradiola i IFN- $\gamma$  povišene su u žena generativne dobi s neaktivnim oblikom SLE, dok su razine vitamina D snižene u istih u usporedbi s zdravim ispitanicama.

IFN- $\gamma$  je viši pri nižim razinama vitamina D, što bi moglo upućivati na zaštitnu ulogu ovog vitamina u autoimunoj upali. Ovo istraživanje ističe važnost poznavanja vrijednosti i međusobnog odnosa vitamina D, E<sub>2</sub> i IFN- $\gamma$  u razumijevanju i praćenju SLE.

**Ključne riječi:** sistemski eritemski lupus, interferon-gamma, estradiol, vitamin D.

## 9. SUMMARY

**Background:** Systemic lupus erythematosus (SLE), along with autoantibody production, is undeniably associated with levels of female sex hormones, specifically E<sub>2</sub>. Beneficial effects of D vitamin on the course of autoimmune disorders have been confirmed through numerous studies, while the effect of inflammatory cytokines, especially IFN- $\gamma$ , is still under study.

**Objectives:** The aim of this study was to determine the serum levels of 25-hydroxy-vitamin D<sub>3</sub>, oestradiol and interferon-gamma in female SLE patients of childbearing age with inactive disease, as well as their interconnection.

**Methods:** In total, 36 SLE and 37 control subjects were enrolled in the study. Serum concentrations of 25-OH D<sub>3</sub>, E<sub>2</sub> and IFN- $\gamma$  were measured by radioimmunoassay using a gamma-counter and enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results:** The concentration of 25-OH D<sub>3</sub> was lower in SLE patients compared to the control group ( $p=0.001$ ), while E<sub>2</sub> was higher ( $p<0.001$ ). In vitamin D deficient (25-OH D<sub>3</sub>  $\leq$  20 ng/ml) SLE patients, IFN- $\gamma$  was 150% higher compared to patients with 25-OH D<sub>3</sub> > 20 ng/ml and the control group ( $p=0.008$ ). The concentration of E<sub>2</sub> was greater in all SLE patients compared to the control group, independent of the vitamin D level ( $p=0.009$  and  $p=0.035$ , respectively). We found a positive correlation between E<sub>2</sub> and IFN- $\gamma$  in SLE patients and the control group ( $p=0.027$  and  $p<0.05$ , respectively). Vitamin 25-OH D<sub>3</sub> positively correlated with dsDNA and Sm antibodies, while E<sub>2</sub> was positively correlated only with dsDNA antibodies.

**Conclusions:** Concentration of oestradiol and IFN- $\gamma$  was elevated in SLE patients with inactive disease, while the concentration of vitamin D was decreased compared to healthy

subjects. IFN- $\gamma$  was elevated with decreased levels of vitamin D, which may indicate protective role of vitamin D in autoimmune inflammation. This study promotes the significance of learning the interaction between vitamin D, E<sub>2</sub> and IFN- $\gamma$  in understanding and monitoring the SLE.

**Key words:** systemic lupus erythematosus, interferon-gamma, estradiol, vitamin D.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Boumpas DT, Fessler BJ, Austin HA, 3rd, Balow JE, Klippel JH and Lockshin MD. Systemic lupus erythematosus: emerging concepts. Part 2: Dermatologic and joint disease, the antiphospholipid antibody syndrome, pregnancy and hormonal therapy, morbidity and mortality, and pathogenesis. *Annals of internal medicine*. 1995; 123: 42-53.
2. Zhang J, Jacobi AM, Wang T, Berlin R, Volpe BT and Diamond B. Polyreactive autoantibodies in systemic lupus erythematosus have pathogenic potential. *Journal of autoimmunity*. 2009; 33: 270-4.
3. Tenbrock K, Juang YT, Kyttaris VC and Tsokos GC. Altered signal transduction in SLE T cells. *Rheumatology*. 2007; 46: 1525-30.
4. Kyttaris VC, Krishnan S and Tsokos GC. Systems biology in systemic lupus erythematosus: integrating genes, biology and immune function. *Autoimmunity*. 2006; 39: 705-9.
5. Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine*. 1993; 72: 113-24.
6. Cohen-Solal JF, Jeganathan V, Grimaldi CM, Peeva E and Diamond B. Sex hormones and SLE: influencing the fate of autoreactive B cells. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006; 305: 67-88.
7. Rider V and Abdou NI. Gender differences in autoimmunity: molecular basis for estrogen effects in systemic lupus erythematosus. *International immunopharmacology*. 2001; 1: 1009-24.

8. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 1997; 40: 1725.
9. Gladman DD, Goldsmith CH, Urowitz MB, et al. The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus International Comparison. *The Journal of rheumatology*. 2000; 27: 373-6.
10. Cutolo M. Vitamin D and autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatology*. 2009; 48: 210-2.
11. Adorini L and Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nature clinical practice Rheumatology*. 2008; 4: 404-12.
12. Norman AW, Henry HL, Bishop JE, Song XD, Bula C and Okamura WH. Different shapes of the steroid hormone 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$  act as agonists for two different receptors in the vitamin D endocrine system to mediate genomic and rapid responses. *Steroids*. 2001; 66: 147-58.
13. Kamen DL, Cooper GS, Bouali H, Shaftman SR, Hollis BW and Gilkeson GS. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*. 2006; 5: 114-7.
14. Lemire JM, Ince A and Takashima M. 1,25-Dihydroxyvitamin D $_3$  attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity*. 1992; 12: 143-8.
15. Cantorna MT, Hayes CE and DeLuca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D $_3$  reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93: 7861-4.
16. Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O and Bouillon R. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D $_3$ . *Diabetologia*. 1994; 37: 552-8.

17. Zella JB, McCary LC and DeLuca HF. Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2003; 417: 77-80.
18. Froicu M, Weaver V, Wynn TA, McDowell MA, Welsh JE and Cantorna MT. A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. *Molecular endocrinology*. 2003; 17: 2386-92.
19. Nagpal S, Na S and Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocrine reviews*. 2005; 26: 662-87.
20. Amital H, Szekanecz Z, Szucs G, et al. Serum concentrations of 25-OH vitamin D in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are inversely related to disease activity: is it time to routinely supplement patients with SLE with vitamin D? *Annals of the rheumatic diseases*. 2010; 69: 1155-7.
21. Cutolo M and Otsa K. Review: vitamin D, immunity and lupus. *Lupus*. 2008; 17: 6-10.
22. Cutolo M, Otsa K, Paolino S, Yprus M, Veldi T and Serio B. Vitamin D involvement in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythaematosus. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009; 68: 446-7.
23. Kamen DL and Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *Journal of molecular medicine*. 2010; 88: 441-50.
24. Linker-Israeli M, Elstner E, Klinenberg JR, Wallace DJ and Koeffler HP. Vitamin D(3) and its synthetic analogs inhibit the spontaneous in vitro immunoglobulin production by SLE-derived PBMC. *Clinical immunology*. 2001; 99: 82-93.
25. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S and Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on human B cell differentiation. *Journal of immunology*. 2007; 179: 1634-47.



26. Toubi E and Shoenfeld Y. The role of vitamin D in regulating immune responses. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2010; 12: 174-5.
27. Cutolo M. Vitamin D or hormone D deficiency in autoimmune rheumatic diseases, including undifferentiated connective tissue disease. *Arthritis research & therapy*. 2008; 10: 123.
28. Adams JS and Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2008; 4: 80-90.
29. Munoz LE, Schiller M, Zhao Y, Voll RE, Schett G and Herrmann M. Do low vitamin D levels cause problems of waste removal in patients with SLE? *Rheumatology*. 2012; 51: 585-7.
30. Munoz LE, Gaipl US, Franz S, et al. SLE--a disease of clearance deficiency? *Rheumatology*. 2005; 44: 1101-7.
31. Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nature immunology*. 2001; 2: 777-80.
32. Dinesh RK, Hahn BH and Singh RP. PD-1, gender, and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2010; 9: 583-7.
33. Lleo A, Battezzati PM, Selmi C, Gershwin ME and Podda M. Is autoimmunity a matter of sex? *Autoimmunity reviews*. 2008; 7: 626-30.
34. Rubtsov AV, Rubtsova K, Kappler JW and Marrack P. Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2010; 9: 494-8.
35. Hazes JM, Silman AJ, Brand R, Spector TD, Walker DJ and Vandenbroucke JP. Influence of oral contraception on the occurrence of rheumatoid arthritis in female sibs. *Scandinavian journal of rheumatology*. 1990; 19: 306-10.

36. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, et al. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus*. 2004; 13: 635-8.
37. Tanriverdi F, Silveira LF, MacColl GS and Bouloux PM. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *The Journal of endocrinology*. 2003; 176: 293-304.
38. Da Silva JA. Sex hormones, glucocorticoids and autoimmunity: facts and hypotheses. *Annals of the rheumatic diseases*. 1995; 54: 6-16.
39. Lahita RG. The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Current opinion in rheumatology*. 1999; 11: 352-6.
40. Lahita RG. Sex hormones and systemic lupus erythematosus. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2000; 26: 951-68.
41. Cutolo M. Estrogen metabolites: increasing evidence for their role in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*. 2004; 31: 419-21.
42. Lahita RG. The connective tissue diseases and the overall influence of gender. *International journal of fertility and menopausal studies*. 1996; 41: 156-65.
43. McMurray RW. Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions. *International immunopharmacology*. 2001; 1: 995-1008.
44. Ackerman LS. Sex hormones and the genesis of autoimmunity. *Archives of dermatology*. 2006; 142: 371-6.
45. Rider V, Jones SR, Evans M and Abdou NI. Molecular mechanisms involved in the estrogen-dependent regulation of calcineurin in systemic lupus erythematosus T cells. *Clinical immunology*. 2000; 95: 124-34.

46. Verthelyi D, Petri M, Ylamus M and Klinman DM. Disassociation of sex hormone levels and cytokine production in SLE patients. *Lupus*. 2001; 10: 352-8.
47. Cutolo M, Sulli A, Seriola B, Accardo S and Masi AT. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clinical and experimental rheumatology*. 1995; 13: 217-26.
48. Cutolo M and Wilder RL. Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2000; 26: 825-39.
49. Kanda N and Tamaki K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999; 103: 282-8.
50. Kanda N, Tsuchida T and Tamaki K. Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 1997; 40: 1703-11.
51. Rider V, Jones S, Evans M, Bassiri H, Afsar Z and Abdou NI. Estrogen increases CD40 ligand expression in T cells from women with systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*. 2001; 28: 2644-9.
52. Siiteri PK, Jones LA, Roubinian J and Talal N. Sex steroids and the immune system--I. Sex difference in autoimmune disease in NZB/NZW hybrid mice. *Journal of steroid biochemistry*. 1980; 12: 425-32.
53. Roubinian JR, Talal N, Greenspan JS, Goodman JR and Siiteri PK. Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. *The Journal of experimental medicine*. 1978; 147: 1568-83.
54. Zeng D, Lee MK, Tung J, Brendolan A and Strober S. Cutting edge: a role for CD1 in the pathogenesis of lupus in NZB/NZW mice. *Journal of immunology*. 2000; 164: 5000-4.

55. Wither JE, Roy V and Brennan LA. Activated B cells express increased levels of costimulatory molecules in young autoimmune NZB and (NZB x NZW)F(1) mice. *Clinical immunology*. 2000; 94: 51-63.
56. Hughes GC, Martin D, Zhang K, et al. Decrease in glomerulonephritis and Th1-associated autoantibody production after progesterone treatment in NZB/NZW mice. *Arthritis and rheumatism*. 2009; 60: 1775-84.
57. Grimaldi CM, Michael DJ and Diamond B. Cutting edge: expansion and activation of a population of autoreactive marginal zone B cells in a model of estrogen-induced lupus. *Journal of immunology*. 2001; 167: 1886-90.
58. Lahita RG. The effects of sex hormones on the immune system in pregnancy. *American journal of reproductive immunology*. 1992; 28: 136-7.
59. Verthelyi D and Ahmed SA. 17 beta-estradiol, but not 5 alpha-dihydrotestosterone, augments antibodies to double-stranded deoxyribonucleic acid in nonautoimmune C57BL/6J mice. *Endocrinology*. 1994; 135: 2615-22.
60. Verthelyi DI and Ahmed SA. Estrogen increases the number of plasma cells and enhances their autoantibody production in nonautoimmune C57BL/6 mice. *Cellular immunology*. 1998; 189: 125-34.
61. Khorasanizadeh S and Rastinejad F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends in biochemical sciences*. 2001; 26: 384-90.
62. O'Malley BW. Coregulators: from whence came these "master genes". *Molecular endocrinology*. 2007; 21: 1009-13.
63. Wolf IM, Heitzer MD, Grubisha M and DeFranco DB. Coactivators and nuclear receptor transactivation. *Journal of cellular biochemistry*. 2008; 104: 1580-6.

64. Ordentlich P, Downes M and Evans RM. Corepressors and nuclear hormone receptor function. *Current topics in microbiology and immunology*. 2001; 254: 101-16.
65. Burakov D, Crofts LA, Chang CP and Freedman LP. Reciprocal recruitment of DRIP/mediator and p160 coactivator complexes in vivo by estrogen receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277: 14359-62.
66. Chiba N, Suldan Z, Freedman LP and Parvin JD. Binding of liganded vitamin D receptor to the vitamin D receptor interacting protein coactivator complex induces interaction with RNA polymerase II holoenzyme. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275: 10719-22.
67. Ohashi PS. T-cell signalling and autoimmunity: molecular mechanisms of disease. *Nature reviews Immunology*. 2002; 2: 427-38.
68. Bauer JW, Baechler EC, Petri M, et al. Elevated serum levels of interferon-regulated chemokines are biomarkers for active human systemic lupus erythematosus. *PLoS medicine*. 2006; 3: e491.
69. Kozyrev SV and Alarcon-Riquelme ME. The genetics and biology of Irf5-mediated signaling in lupus. *Autoimmunity*. 2007; 40: 591-601.
70. Kariuki SN, Kirou KA, MacDermott EJ, Barillas-Arias L, Crow MK and Niewold TB. Cutting edge: autoimmune disease risk variant of STAT4 confers increased sensitivity to IFN-alpha in lupus patients in vivo. *Journal of immunology*. 2009; 182: 34-8.
71. Abdou NI, Rider V, Greenwell C, Li X and Kimler BF. Fulvestrant (Faslodex), an estrogen selective receptor downregulator, in therapy of women with systemic lupus erythematosus. clinical, serologic, bone density, and T cell activation marker studies: a double-blind placebo-controlled trial. *The Journal of rheumatology*. 2008; 35: 797.

72. Rider V, Foster RT, Evans M, Suenaga R and Abdou NI. Gender differences in autoimmune diseases: estrogen increases calcineurin expression in systemic lupus erythematosus. *Clinical immunology and immunopathology*. 1998; 89: 171-80.
73. Gonzalez DA, Diaz BB, Rodriguez Perez Mdel C, Hernandez AG, Chico BN and de Leon AC. Sex hormones and autoimmunity. *Immunology letters*. 2010; 133: 6-13.
74. van Vollenhoven RF. Dehydroepiandrosterone for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2002; 3: 23-31.
75. Olsen NJ and Kovacs WJ. Gonadal steroids and immunity. *Endocrine reviews*. 1996; 17: 369-84.
76. Peeva E, Grimaldi C, Spatz L and Diamond B. Bromocriptine restores tolerance in estrogen-treated mice. *The Journal of clinical investigation*. 2000; 106: 1373-9.
77. Lord RS, Bongiovanni B and Bralley JA. Estrogen metabolism and the diet-cancer connection: rationale for assessing the ratio of urinary hydroxylated estrogen metabolites. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. 2002; 7: 112-29.
78. Benten WP, Lieberherr M, Giese G and Wunderlich F. Estradiol binding to cell surface raises cytosolic free calcium in T cells. *FEBS letters*. 1998; 422: 349-53.
79. Parkin J and Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001; 357: 1777-89.
80. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annual review of immunology*. 2005; 23: 275-306.
81. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. 2003; 8: 223-46.
82. Meyer O. Interferons and autoimmune disorders. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2009; 76: 464-73.

83. Vilcek J. Novel interferons. *Nature immunology*. 2003; 4: 8-9.
84. Hermant P and Michiels T. Interferon-lambda in the context of viral infections: production, response and therapeutic implications. *Journal of innate immunity*. 2014; 6: 563-74.
85. Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, et al. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*. 2003; 424: 516-23.
86. Moiseeva O, Mallette FA, Mukhopadhyay UK, Moores A and Ferbeyre G. DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation. *Molecular biology of the cell*. 2006; 17: 1583-92.
87. Plataniias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature reviews Immunology*. 2005; 5: 375-86.
88. Samarajiwa SA, Forster S, Auchetl K and Hertzog PJ. INTERFEROME: the database of interferon regulated genes. *Nucleic acids research*. 2009; 37: D852-7.
89. Paolicelli D, Direnzo V and Trojano M. Review of interferon beta-1b in the treatment of early and relapsing multiple sclerosis. *Biologics : targets & therapy*. 2009; 3: 369-76.
90. Goldstein D and Laszlo J. The role of interferon in cancer therapy: a current perspective. *CA: a cancer journal for clinicians*. 1988; 38: 258-77.
91. Hauschild A, Gogas H, Tarhini A, et al. Practical guidelines for the management of interferon-alpha-2b side effects in patients receiving adjuvant treatment for melanoma: expert opinion. *Cancer*. 2008; 112: 982-94.
92. Kotzin BL. Systemic lupus erythematosus. *Cell*. 1996; 85: 303-6.
93. Hooks JJ, Moutsopoulos HM and Notkins AL. Circulating interferon in human autoimmune diseases. *Texas reports on biology and medicine*. 1981; 41: 164-8.

94. Kim T, Kanayama Y, Negoro N, Okamura M, Takeda T and Inoue T. Serum levels of interferons in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology*. 1987; 70: 562-9.
95. Pollard KM, Cauvi DM, Toomey CB, Morris KV and Kono DH. Interferon-gamma and systemic autoimmunity. *Discovery medicine*. 2013; 16: 123-31.
96. Horwitz DA, Gray JD, Behrendsen SC, et al. Decreased production of interleukin-12 and other Th1-type cytokines in patients with recent-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 1998; 41: 838-44.
97. Liu TF and Jones BM. Impaired production of IL-12 in system lupus erythematosus. II: IL-12 production in vitro is correlated negatively with serum IL-10, positively with serum IFN-gamma and negatively with disease activity in SLE. *Cytokine*. 1998; 10: 148-53.
98. Lee HM, Mima T, Sugino H, et al. Interactions among type I and type II interferon, tumor necrosis factor, and beta-estradiol in the regulation of immune response-related gene expressions in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*. 2009; 11: R1.
99. Bennett L, Palucka AK, Arce E, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *The Journal of experimental medicine*. 2003; 197: 711-23.
100. Hertzog P, Forster S and Samarajiwa S. Systems biology of interferon responses. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2011; 31: 5-11.
101. Hu X and Ivashkiv LB. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity*. 2009; 31: 539-50.
102. O'Shea JJ and Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity*. 2012; 36: 542-50.



103. Billiau A and Matthys P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine & growth factor reviews*. 2009; 20: 97-113.
104. Baudino L, Azeredo da Silveira S, Nakata M and Izui S. Molecular and cellular basis for pathogenicity of autoantibodies: lessons from murine monoclonal autoantibodies. *Springer seminars in immunopathology*. 2006; 28: 175-84.
105. Zhu J, Yamane H and Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annual review of immunology*. 2010; 28: 445-89.
106. Murphy KM and Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nature immunology*. 2010; 11: 674-80.
107. Paunovic V, Carroll HP, Vandembroeck K and Gadina M. Signalling, inflammation and arthritis: crossed signals: the role of interleukin (IL)-12, -17, -23 and -27 in autoimmunity. *Rheumatology*. 2008; 47: 771-6.
108. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL and Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annual review of immunology*. 2003; 21: 713-58.
109. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011; 96: 1911-30.
110. Borges MC, Martini LA and Rogero MM. Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases. *Nutrition*. 2011; 27: 399-404.
111. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C and Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Current opinion in pharmacology*. 2010; 10: 482-96.
112. Guillot X, Semerano L, Saldenberg-Kermanac'h N, Falgarone G and Boissier MC. Vitamin D and inflammation. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2010; 77: 552-7.

113. Toloza SM, Cole DE, Gladman DD, Ibanez D and Urowitz MB. Vitamin D insufficiency in a large female SLE cohort. *Lupus*. 2010; 19: 13-9.
114. Cooper GS, Wither J, Bernatsky S, et al. Occupational and environmental exposures and risk of systemic lupus erythematosus: silica, sunlight, solvents. *Rheumatology*. 2010; 49: 2172-80.
115. Bogaczewicz J, Sysa-Jedrzejowska A, Arkuszewska C, et al. Vitamin D status in systemic lupus erythematosus patients and its association with selected clinical and laboratory parameters. *Lupus*. 2012; 21: 477-84.
116. Becker A, Fischer R and Schneider M. [Bone density and 25-OH vitamin D serum level in patients with systemic lupus erythematosus]. *Zeitschrift fur Rheumatologie*. 2001; 60: 352-8.
117. Huisman AM, White KP, Algra A, et al. Vitamin D levels in women with systemic lupus erythematosus and fibromyalgia. *The Journal of rheumatology*. 2001; 28: 2535-9.
118. Damanhoury LH. Vitamin D deficiency in Saudi patients with systemic lupus erythematosus. *Saudi medical journal*. 2009; 30: 1291-5.
119. Ben-Zvi I, Aranow C, Mackay M, et al. The impact of vitamin D on dendritic cell function in patients with systemic lupus erythematosus. *PloS one*. 2010; 5: e9193.
120. Mok CC, Birmingham DJ, Ho LY, Hebert LA, Song H and Rovin BH. Vitamin D deficiency as marker for disease activity and damage in systemic lupus erythematosus: a comparison with anti-dsDNA and anti-C1q. *Lupus*. 2012; 21: 36-42.
121. Petri M, Bello KJ, Fang H and Magder LS. Vitamin D in systemic lupus erythematosus: modest association with disease activity and the urine protein-to-creatinine ratio. *Arthritis and rheumatism*. 2013; 65: 1865-71.

122. Karimzadeh H, Shirzadi M and Karimifar M. The effect of Vitamin D supplementation in disease activity of systemic lupus erythematosus patients with Vitamin D deficiency: A randomized clinical trial. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2017; 22: 4.
123. Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annual review of immunology*. 2008; 26: 453-79.
124. Min DJ, Cho ML, Cho CS, et al. Decreased production of interleukin-12 and interferon-gamma is associated with renal involvement in systemic lupus erythematosus. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2001; 30: 159-63.
125. Postal M, Costallat LT and Appenzeller S. Biological therapy in systemic lupus erythematosus. *International journal of rheumatology*. 2012; 2012: 578641.
126. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine reviews*. 2007; 28: 521-74.
127. Siracusa MC, Overstreet MG, Housseau F, Scott AL and Klein SL. 17beta-estradiol alters the activity of conventional and IFN-producing killer dendritic cells. *Journal of immunology*. 2008; 180: 1423-31.
128. Murakami M, Kumagai S, Sugita M, Iwai K and Imura H. In vitro induction of IgG anti-DNA antibody from high density B cells of systemic lupus erythematosus patients by an HLA DR-restricted T cell clone. *Clinical and experimental immunology*. 1992; 90: 245-50.
129. Kanda N, Tsuchida T and Tamaki K. Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 1999; 42: 328-37.
130. Silva CA, Leal MM, Leone C, et al. Gonadal function in adolescents and young women with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2002; 11: 419-25.

131. Cabral de Sousa D, das Chagas Medeiros MM, Trindade Viana VS and Salani Mota RM. Anti-corpus luteum antibody and menstrual irregularity in patients with systemic lupus erythematosus and Hashimoto's thyroiditis. *Lupus*. 2005; 14: 618-24.
132. Brunner HI, Bishnoi A, Barron AC, et al. Disease outcomes and ovarian function of childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2006; 15: 198-206.
133. Kassi E and Moutsatsou P. Estrogen receptor signaling and its relationship to cytokines in systemic lupus erythematosus. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010; 2010: 317452.
134. Aranow C. Vitamin D and the immune system. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 2011; 59: 881-6.
135. Barrera D, Avila E, Hernandez G, et al. Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007; 103: 529-32.
136. Marcus R, Villa ML, Cheema M, Cheema C, Newhall K and Holloway L. Effects of conjugated estrogen on the calcitriol response to parathyroid hormone in postmenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1992; 74: 413-8.
137. Cheema C, Grant BF and Marcus R. Effects of estrogen on circulating "free" and total 1,25-dihydroxyvitamin D and on the parathyroid-vitamin D axis in postmenopausal women. *The Journal of clinical investigation*. 1989; 83: 537-42.
138. Knight JA, Wong J, Blackmore KM, Raboud JM and Vieth R. Vitamin D association with estradiol and progesterone in young women. *Cancer causes & control : CCC*. 2010; 21: 479-83.

139. Aranow C, Kamen DL, Dall'Era M, et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of the Effect of Vitamin D3 on the Interferon Signature in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & rheumatology*. 2015; 67: 1848-57.

# 11. ŽIVOTOPIS

## OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Višnja Kokić Maleš

Adresa: Zrinjsko-Frankopanska 2b, 21000 Split

Mobitel: +385915162200

Email: [kokicvisnja@gmail.com](mailto:kokicvisnja@gmail.com)

Državljanstvo: Hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 23.05.1984

## ŠKOLOVANJE

### 2002.

Osnovnu školu „Meje“ i privatnu jezičnu gimnaziju „Pitagora“ s odličnim uspjehom završila sam u Splitu.

### 1998.

Završila dvije osnovne glazbene škole „Josip Hatze“ - smjer klavir te smjer violina. Iste godine upisala sam srednju glazbenu školu, smjer teorija glazbe, te srednju glazbenu školu smjer violina.

### 2001.

Završila sam obje srednje glazbene škole s odličnim uspjehom.

### 2001 i 2002.

Tijekom srednje škole ljetne praznike provodila sam u inozemstvu gdje sam se usavršavala u engleskom, talijanskom i njemačkom jeziku (London, Freiburg i Firenca).

Sve tečajeve sam uredno položila te aktivno govorim i pišem engleski, talijanski i njemački jezik.

**2002.**

Upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala sam u lipnju 2009 s prosjekom ocjena 4.21.

**2009.**

Započela sam liječnički staž u Ustanovi za Hitnu medicinu Split.

**2009./2010.**

Upisala sam postdiplomski doktorski studij *Medicina utemeljena na dokazima* u Splitu te položila obvezatne ispite s prve dvije godine.

**2010.**

Položila sam državni ispit.

**2010. - 2017.**

Završila sam postdiplomski stručni tečaj iz endokrinologije u travnju 2010. u Bostonu (SAD) u trajanju od tjedan dana. U Zagrebu u više navrata 2010., 2011., 2013., 2014., 2015., 2016 i 2017. godine u organizaciji prof dr. sc. Mirka Koršića, a kasnije i prof dr. sc. Darka Kaštelana, s aktivnim sudjelovanjem i prikazima slučaja uz mentorstvo dr.sc. Anele Novak.

**2011.**

Upisala sam postdiplomski stručni tečaj Medicinskog fakulteta u Zagrebu *Ultrazvuk štitnjače* pod vodstvom prim. Z. B. Žigman i prim. H. Tomić te položila ispit 2012. godine. Iste godine odslušala sam i položila postdiplomski stručni tečaj Medicinskog fakulteta u Splitu *Ultrazvuk abdomena* pod mentorstvom prof. Izeta Hoze.

**2012.**

Započela sam specijalizaciju interne medicine za potrebe Zavoda za endokrinologiju i dijabetologiju KBC Split.

**2015.**

Položila sam tečaj iz naprednog uzdržavanja života pri MEF u Rijeci.

## **OBJAVLJENI RADOVI**

Do sada sam aktivno kao autor sudjelovala u 13 radova:

1. **Kokic V**, Martinovic Kaliterna D, Radic M, Tandara L, Perkovic D. Association between vitamin D, oestradiol and interferon-gamma in female patients with inactive systemic lupus erythematosus: A cross-sectional study, *J Int Med Res* 2017 DOI: 10.1177/0300060517734686
2. **Kokic V**, Kokic S, Krnić M, Petrić M, Liberati AM, Šimac P, Milenković T, Čapkun V, Rahelić D, Blaslov K. Prediabetes awareness among Southeastern European physicians, *J Diabetes Investig* 2017 **DOI:** 10.1111/jdi.12740
3. **Kokić V**, Martinović Kaliterna D, Radić M, Perković D, Cvek M, Čapkun V. Relationship between vitamin D, IFN- $\gamma$  and E<sub>2</sub> levels in systemic lupus erythematosus, *Lupus*, 2015 Sep 24. pii:0961203315605367. [Epub ahead of print].
4. Gradiser M, Cmrečnjak J, Ostrički B, Marodi I, **Kokić V**, Kokić S, Pal A. A case of transient constrictive pericarditis in a 42-year-old pateint, *Coll Antropol.*, 2014;38(1):337-9.
5. Grulović B, Pucelj MR, Krnić M, **Kokić V**. Impact of prostaglandin F<sub>2</sub>-alpha and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in pain in patients undergoing thermal balloon endometrial ablation, *Coll Antropol.*, 2014;37(14):1185-90.



6. Korljan Jelaska B, Ostojić SB, Berović N, **Kokić V**. Continuous glucose monitoring in the treatment of obesity in patients with glycogen storage disease type II, *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*. 2013, 2013:130056. doi:10.1530/EDM-13-0056. Epub 2014 Dec 1.
7. Duvnjak L, **Kokić V**, Bulum T, Kokić S, Krnić M, Hozo IS. The metabolic syndrome is associated with high-normal urinary albumin excretion and retinopathy in normoalbuminuric type 1 diabetic patients, *Collegium Antropologicum*, 2012;36:1373-8.
8. Modun D, Krnić M, Vuković J, **Kokić V**, Kukoč-Modun L, Tsikas D, Dujčić Ž. Plasma nitrite concentration decreases after hyperoxia-induced oxidative stress in healthy humans. *Clin Physiol Funct Imaging*, 2012; 32:404-8.
9. Kokić S., **Kokić V.**, Krnić M., Mirić L., Jovanović Ž., Orlić-Crnčević Ž. Advantage of prandial insulin as a therapeutic approach in initial secondary pancreatic  $\beta$ -cell exhaustion in type 2 diabetic patients, *Diabetologia Croatica*, 2010; 39:37-42.
10. Bratanić A, Kokić S, Hozo I, Barišić I, **Kokić V**. Long-term therapy with proton pump inhibitors is associated with decreased bone density, *Med Hypotheses*, 2009; 72(5):608-9.
11. Dovžak Bajs I., Cvjetko I., Car D., **Kokić V**. Study of friction and loosening in hip endoprostheses, *Acta Medica Croatica*, 2003; 56(4-5): 151-155.
12. Dovžak Bajs I., Cvjetko I., Car D., **Kokić V**. Prijelomi u starijoj životnoj dobi, *Medix* god. IX br. 46/47 2003.

13. Dovžak Bajs I., Cvjetko I., Car D., **Kokić V.** Prometni traumatizam, *Medix*, god. VII, br.45 ,31-36, 2002.

## **MATERINJI JEZIK**

Hrvatski

## **OSTALI JEZICI**

Engleski, talijanski i njemački.