

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.295>

<https://orcid.org/0000-0002-6229-4177>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Eglė

PUNCEVIČIENĖ

Reumatoidinio artrito etiopatogenezės ir klinikinės eigos sąsajos su genetiniais ir epigenetiniais veiksniais

DAKTARO DISERTACIJA

Medicinos ir sveikatos mokslai

Medicina (M 001)

VILNIUS 2022

Disertacija rengta 2015–2021 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto, Klinikinės medicinos instituto, Reumatologijos, ortopedijos – traumatologijos ir rekonstrukcinės chirurgijos klinikoje.

Mokslinius tyrimus iš dalies rėmė Lietuvos mokslo taryba (LMT) Mokslininkų grupių projekto lėšomis.

Mokslinė vadovė – prof. dr. Irena Butrimienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Mokslinė konsultantė – prof. dr. Sonata Jarmalaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.295>

<https://orcid.org/0000-0002-6229-4177>

VILNIUS UNIVERSITY

Eglė

PUNCEVIČIENĖ

Associations of Rheumatoid Arthritis Etiopathogenesis and Clinical Course with Genetic and Epigenetic Factors

DOCTORAL DISSERTATION

Medicine and Health Sciences

Medicine (M 001)

VILNIUS 2022

The dissertation was prepared between 2015 and 2021 in Vilnius University, Faculty of Medicine, Institute of Clinical Medicine, Clinic of Rheumatology, Orthopaedics Traumatology and Reconstructive Surgery.

The research was partially funded by the Research Council of Lithuania (LMTLT) from the Scientists group project.

Academic supervisor – Prof. Dr. Irena Butrimienė (Vilnius University, Medicine and health sciences, Medicine – M 001).

Academic consultant – Prof. Dr. Sonata Jarmalaitė (Vilnius University, Natural sciences, Biology – N 010).

Skiriu tėčiui

SANTRUMPOS

ACR (angl. *American College of Rheumatology*) – Amerikos reumatologų kolegija

AKR – alveolinio kaulo rezorbcija

Anti-CCP – antikūnai prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą

CYP24A1 (angl. *Cytochrome P450 Family 24 Subfamily A Member 1*) – citochromo P450 24A1 genas

CYP27B1 (angl. *Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B Member 1*) – citochromo P450 27B1 genas

CYP2R1 (angl. *Cytochrome P450 Family 2 Subfamily R Member 1*) – citochromo P450 2R1 genas

CpG (angl. *Cytosine-phosphate-Guanine*) – citozino – guanino dinukleotidas

CRB – C reaktyvus baltymas

DAS28 (angl. *Disease Activity Score*) – ligos aktyvumo indeksas vertinant 28 sąnarius

DNMT – DNR metiltransferazė

DNR – deoksiribonukleorūgštis

EULAR (angl. *European League Against Rheumatism*) – Europos priešreumatinė lyga

FGF 23 (angl. *fibroblast growth factor 23*) – fibroblastų augimo faktorius 23

HLA (angl. *human leukocyte antigen*) – žmogaus leukocitų antigenas

H–V (angl. *Hardy–Weinberg*) – Hardžio ir Veinbergo dėsnis

IL – interleukinas

JAV – Jungtinės Amerikos Valstijos

KI – kraujavimo indeksas

KMI – kūno masės indeksas

kPGR – kiekybinė polimerazės grandininė reakcija

LMV – ligą modifikuojantys vaistai

MHC (angl. *major histocompatibility complex*) – audinių suderinamumo kompleksas

MD – metilinimo dažnis
MI – metilinimo intensyvumas
MMP – matrikso metaloproteinazė
OASF – osteoartrito sinovijos fibroblastai
PD – periodontitas
PI – pasikliautinis intervalas
PPAD4 – peptidilarginindeiminazė 4
PNL – periodonto jungties netekimo lygis
PTH – parathormonas
RA – reumatoidinis artritas
RAID (angl. *Rheumatoid Arthritis Impact of Disease*) – reumatoidinio artrito ligos poveikio klausimynas
RANKL (angl. *Receptor activator of the nuclear factor kappa B ligand*) – branduolio faktoriaus kapa B ligando receptorių aktyvatorius
RASf – reumatoidinio artrito sinovijos fibroblastai
RF – reumatoidinis faktorius
RNR – ribonukleino rūgštis
SAH – S-adenozilhomocisteinas
SAM – S-adenozilmetioninas
SE (angl. *shared epitope*) – bendras epitopas
SN – standartinis nuokrypis
SVK – sveikatos vertinimo klausimynas
ŠS – šansų santykis
UV – ultravioletiniai spinduliai
UTR (angl. *untranslated region*) – netransliuojamas regionas
VAS – vizualinė analogijos skalė
VEGF (angl. *vascular endothelial growth factor*) – kraujagyslių endotelio augimo faktorius

VDR – vitamino D receptorius

VDRE (angl. *vitamin D response elements*) – vitamino D atsako elementai

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas

VULSK – Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos

Th (angl. *T helper*) – T pagalbinė ląstelė

Treg – T reguliacinė ląstelė

TNF- α (angl. *Tumor necrosis factor α*) – naviko nekrozės faktorius α

ZG – zondavimo gylis

TURINYS

1. ĮVADAS.....	11
1.1. Įžanga.....	11
1.2. Darbo aktualumas ir naujumas	13
1.3. Darbo tikslas ir uždaviniai	14
1.4. Tyrimo hipotezė ir ginamieji teiginiai	14
2. LITERATŪROS APŽVALGA	15
2.1. Reumatoidinis artritas.....	15
2.1.1. Reumatoidinio artrito etiopatogenezė.....	15
2.1.2. Reumatoidinis artritas ir genetiniai veiksniai	19
2.1.3. Reumatoidinis artritas ir epigenetiniai veiksniai	20
2.2. Vitaminas D.....	23
2.2.1. Vitamino D apykaita.....	24
2.2.2. Vitaminas D ir reumatoidinis artritas	27
2.2.3. <i>VDR</i> genas ir jo polimorfizmai.....	32
2.2.4. Vitamino D atsako kelio epigenetinis valdymas	34
3. TYRIMO METODIKA.....	37
3.1. Tiriamųjų įtraukimo ir neįtraukimo į tyrimą kriterijai	38
3.2. Vitamino D koncentracijos nustatymas	40
3.3. <i>VDR</i> genotipavimo tyrimai	41
3.3.1. Ląstelių paruošimas ir DNR gryninimas	41
3.3.2. Kiekybinė polimerazės grandininė reakcija (kPGR) .	42
3.4. <i>VDR</i> , <i>CYP2R1</i> , <i>CYP24A1</i> metilinimo tyrimai	42
3.4.1. DNR bisulfitinė modifikacija	43
3.4.2. <i>VDR</i> , <i>CYP2R1</i> , <i>CYP24A1</i> pirosekoskaita.....	44
3.5. Periodontologinis tiriamųjų įvertinimas	44
3.6. Statistinė duomenų analizė	45
4. REZULTATAI	46
4.1. Demografiniai ir klinikiniai tiriamųjų duomenys	46
4.2. Vitamino D kiekio ir reumatoidinio artrito klinikinių duomenų sąsajos	47
4.3. <i>VDR</i> geno polimorfizmų analizė	48
4.4. <i>VDR</i> , <i>CYP2R1</i> , <i>CYP24A1</i> genų metilinimo analizės rezultatai	51
4.5. Lėtinio periodontito ryšys su reumatoidiniu artritu	57

5.	REZULTATŲ APTARIMAS	61
5.1.	Vitamino D reikšmė ir <i>VDR</i> geno polimorfizmų dažnis tarp reumatoidiniu artritu sergančių pacientų tirtoje Lietuvos populiacijoje	61
5.2.	Vitamino D atsako kelio genų metilinimo sąsajos su reumatoidiniu artritu ir vitamino D kiekiu.....	64
5.3.	Lėtinio periodontito ir reumatoidinio artrito sąsajos	67
6.	IŠVADOS.....	71
7.	PRAKTINĖ DARBO VERTĖ	71
8.	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	73
9.	PRIEDAI	99
9.1.	Publikacijų sąrašas	99
9.2.	Pranešimai mokslinėse konferencijose	100
9.3.	Moksliniai projektai vykdyti doktorantūros studijų laikotarpiu	101
9.4.	Tiriamųjų anketos	102
9.5.	Leidimai atlikti biomedicininį tyrimą	113

1. ĮVADAS

1.1. Įžanga

Reumatoidinis artritas (RA) – vienas dažniausių lėtinių autoimuninių uždegiminių artritų, pasireiškiančių ne tik sinovinio audinio, bet ir kitų organų ir sistemų pažeidimu. Ligos progresavimas yra susijęs su blogesne gyvenimo kokybe, lemia didesnius laikino ir nuolatinio neįgalumo bei mirtingumo rodiklius [1]. RA paplitimas Europoje ir pasaulyje sudaro 0,3–1 % populiacijos. Šia liga apie du kartus dažniau serga moterys nei vyrai, o ligos pasireiškimo pikas yra apie 50-uosius gyvenimo metus [2, 3]. Remiantis Lietuvos Higienos instituto statistinio duomenų portalo duomenimis, 2020 m. Lietuvoje RA sergančių asmenų skaičius (ligotumas) buvo 15249 arba 5,46 atvejo 1000 gyventojų (<https://stat.hi.lt>). Nors iki šiol RA tebėra neaiškios etiologijos liga, tačiau manoma, kad aplinkos, genetinių ir epigenetinių veiksnių kombinacija yra potencialus ligos rizikos veiksnys, nulemiantis palaiptus įgimto ir įgyto imuniteto pokyčius, sąlygojančius autoimunogeniškumą, lėtinį uždegiminį atsaką ir RA pasireiškimą [1, 4].

Vitamino D įtaka autoimuninių ligų, kartu ir RA, etiopatogenezei pastaraisiais dešimtmečiais kelia itin didelį susidomėjimą. Vitamino D trūkumo paplitimas yra nustatomas visame pasaulyje, o RA atveju, atsižvelgiant į geografinį regioną aptinkamas nuo 30 iki 65 % sergančiųjų ir yra didesnis lyginant su bendra populiacija [5]. Taip pat yra pateikiama duomenų apie vitamino D trūkumo sąsajas su didesniais RA ligos aktyvumo, neįgalumo rodikliais bei blogesne gyvenimo kokybe [5–7]. Dėl to vitamino D stoka neretai yra priskiriama prie potencialių ligą sąlygojančių rizikos veiksnių.

Be jau žinomo klasikinio vitamino D poveikio kalcio ir fosforo apykaitai bei kaulų mineralizacijai, vitaminas D, veikdamas kaip hormonas, pasižymi ir imunomoduliacinėmis, priešuždegiminėmis ir net genų raišką reguliuojančiomis savybėmis [8, 9]. Jo aktyvi forma (kalcitriolis) dalyvauja imuninės sistemos ląstelių reguliacijoje ir netiesiogiai slopina jų gaminamų uždegimo mediatorių (pvz., naviko nekrozės faktoriaus- α (angl., *Tumor necrosis factor α* , TNF- α), interleukinų (IL) klasės citokinų ir kt.), svarbių RA patogenezėje sintezę [10]. Atlikdamas savo biologines funkcijas, kalcitriolis jungiasi prie ląstelių branduoliuose esančių vitamino D receptorių (VDR). Pastarųjų aptinkama ne tik imuninės sistemos ląstelėse, bet ir RA paveiktuose sinoviocituose bei chondrocituose [11]. Dėl išvardintų priežasčių vitamino D funkcija tapo tyrimo objektu ir RA ligos atveju. Visgi ar vitamino D trūkumas

yra ligos pasekmė, ar priežastis iki šiol lieka neaišku, be to, skirtingų tyrimų rezultatai dėl vitamino D sąsajų su RA skiriasi.

Yra žinoma, kad VDR koduojančio geno vieno nukleotido polimorfizmai (VNP) gali daryti įtaką vitamino D funkcijai ir kiekiui organizme [6]. Šiuo metu vieni labiausiai ištyrinėtų VDR polimorfizmų RA atveju yra *BsmI*, *ApaI*, *FokI* ir *TaqI*. Yra duomenų, kad tam tikrų geno alelių ar genotipų paplitimas yra susijęs su padidėjusia rizika sirgti RA, tačiau rezultatai skiriasi pagal geografinius regionus ir etnines grupes. Manoma, kad *FokI* variantas yra galbūt susijęs su RA pasireiškimu europiečiams, tuo tarpu *BsmI* – afrikiečiams, o *BsmI* ir *TaqI* sietinas su RA indukuotu kaulinio audinio netekimu europidų (angl. *caucasian*) rasės žmonėms [12, 13, 179]. Lietuvos populiacijoje minėtų polimorfizmų pasiskirstymas ir ryšys su RA kol kas netirti.

Kitas vitamino D poveikio mechanizmas yra siejamas su epigenetiniu jo aktyvumu – procesais turinčiais įtakos genų raiškai nekeičiant deoksiribonukleorūgšties (DNR) sekos [14]. Žinoma, kad vitamino D atsaką gali slopinti DNR hipermetilinimas vitamino D atsako genų (*CYP2R1*, *CYP24A1*, *CYP27B1*), taip pat VDR geno, sekose ir lemti vitamino D homeostazės pokyčius [14]. RA taip pat yra būdingi sisteminiai epigenetiniai pakitimai, nustatomi kaip DNR metilinimo lygio sumažėjimas ne tik artrito pažeistame sąnaryje, bet ir imuninės sistemos ląstelėse [15]. Literatūros duomenimis, vitamino D apykaitos genų metilinimo tyrimai, galintys suteikti daugiau duomenų apie vitamino D trūkumo priežastis ir ryšį su artrito etiopatogeneze RA sergančiųjų populiacijoje, iki šiol neatlikti.

Pastaruoju metu ypatingas dėmesys taip pat yra kreipiamas į kitą RA rizikos veiksnių – lėtinę infekciją burnos ertmėje, kuri per skirtingus patogenezės mechanizmus potencialiai daro įtaką RA išsivystymui bei ligos eigai [16]. Žinoma, kad lėtinį periodontitą (PD) ir RA sieja citokinų TNF- α ir IL-6 hiperprodukcija, bendri genetiniai (pvz., žmogaus leukocitų antigenų (angl. *human leukocyte antigen*, HLA)-DRB1 geno alelio raiška) bei aplinkos rizikos veiksniai, iš kurių vienas – vitamino D trūkumas yra siejamas su sunkesniais PD atvejais, dantenų uždegimu, alveolinio kaulo rezorbcija ir, kaip jau žinoma, RA aktyvumu [17–19]. Pateikiama duomenų, kad aktyviu RA sergantiems pacientams PD patologijos dažnis yra didesnis palyginti su sveika populiacija, taip pat kad asmenims, kuriems nustatytas PD, RA diagnozė patvirtinama dažniau nei neturintiems lėtinio periodontito patologijos asmenims [20, 21]. Iki šiol atlikti tik pavieniai tyrimai, vertinantys

vitamino D sąsajas su RA ir PD patologijomis kartu, taip pat nėra žinomas PD paplitimas tarp RA sergančių pacientų Lietuvoje ir jo reikšmė ligos eigai.

Rengiant šį disertacinį darbą buvo įvertintos apžvelgtų aplinkos, genetinių ir epigenetinių veiksnių sąsajos su RA pasireiškimu ir svarba klinikinei ligos eigai.

1.2. Darbo aktualumas ir naujumas

Galimybė paveikti RA ligos eigą yra svarbi kiekvienam pacientui tiek socioekonominiu, tiek psichologiniu aspektais. Šiuo metu yra surinkta pakankamai duomenų apie vitamino D įtaką įgyto ir įgimto imuniteto funkcijai bei vitamino D stokos ryšį su skirtingais sveikatos sutrikimais, įskaitant autoimunines, kardiovaskulines, infekcines ligas [22]. Vitamino D kiekis tiek sergančiam, tiek sveikam asmeniui priklauso nuo daugelio veiksnių, tokių kaip amžius, kūno masė, sezoniškumas, geografinė padėtis ir etninė grupė, ultravioletinė (UV) spinduliuotė bei papildų vartojimas. Didesnis autoimuninių ligų, taip pat ir RA dažnis yra pastebimas geografinėse platumose, kur aptinkamas ir didesnis vitamino D trūkumas [23]. Mažesnė nei optimali vitamino D koncentracija yra siejama ir su blogiau kontroliuojama RA klinicine išraiška, didesniu ligos aktyvumu, gyvenimo kokybės svyravimais. Nepaisant jau žinomų ir koreguojamų vitamino D kiekį veiksnių, visgi RA sergantys pacientai pasižymi mažesnėmis vitamino D koncentracijomis nei bendra populiacija. To priežastys galėtų būti kompleksiniai įgimti ar įgyti pokyčiai, vykstantys molekulinio lygiu. Kryptingi RA sergančių pacientų genetinių ir epigenetinių veiksnių tyrimai reikalingi siekiant praplėsti šiuo metu mokslinėje literatūroje skelbiamus duomenis apie vitamino D trūkumo priežastis, jo reikšmę ligos eigai ir RA etiopatogenezei.

Šio mokslinio tyrimo metu pirmą kartą Lietuvoje ištirti *VDR* geno VNP RA sergantiems pacientams, įvertintas alelių ir genotipų dažnis tarp atvejų ir sveikų kontrolių. Tyrimo duomenys atskleidė genetinės įvairovės skirtumus, papildė turimas žinias apie genetinių polimorfizmų paplitimą tiriamiesiems Lietuvoje ir galimą įtaką daugiaveiksniam vitamino D metabolizmui. Šio doktorantūros darbo metu pirmą kartą įvertintas ir vitamino D atsako genų metilinimo lygis RA sergantiems pacientams, kuris, remiantis iki šiol publikuotos mokslinės literatūros duomenimis anksčiau šios grupės pacientams nebuvo tirtas. Nustatyti *VDR*, *CYP24A1* ir *CYP2R1* genų metilinimo būklės skirtumai, atlikta koreliacinė kintamųjų analizė. Tyrimas

leido susieti genetinių ir epigenetinių veiksnių ryšį su RA klinikiniais rodikliais, nagrinėtos sąsajos su vitamino D kiekiu. Mokslinio tyrimo metu įvertintas potencialių rizikos veiksnių – vitamino D trūkumo ir lėtinio periodontito – pasireiškimo dažnis tarp RA sergančių pacientų, papildytos žinios apie šių veiksnių įtaką ligos eigai, tokiu būdu gauta praktinė klinikinė nauda siekiant moduluoti artritą.

1.3. Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas

Įvertinti aplinkos, genetinių ir epigenetinių veiksnių (vitamino D koncentracijos, lėtinio periodontito, vitamino D receptoriaus geno polimorfizmų, vitamino D atsako kelio genų DNR metilinimo lygio) įtaką RA sergančių pacientų ligos aktyvumo rodikliams, klinicinei eigai ir ligos pasireiškimo dažniui.

Uždaviniai

1. Ištirti vitamino D (25(OH)D) trūkumo paplitimą sergantiems RA, įvertinti jo ryšį su ligos aktyvumu ir kitais klinikiniais rodikliais.
2. Palyginti *VDR* geno polimorfizmų (*BsmI*, *FokI*, *Apal* ir *TaqI*) alelių ir genotipų dažnį tarp RA sergančiųjų ir kontrolinės grupės tiriamųjų bei nustatyti galimą ryšį su padidėjusia rizika sirgti RA tirtoje Lietuvos populiacijos imtyje ir vitamino D kiekiu.
3. Atlikti vitamino D atsako kelio genų (*VDR*, *CYP2R1* ir *CYP24A1*) epigenetinių pokyčių analizę (DNR metilinimo lygis), palyginti skirtumus tarp sergančių RA ir kontrolinės grupės tiriamųjų bei įvertinti ryšį su vitamino D kiekiu.
4. Įvertinti lėtinio periodontito paplitimą sergančių RA grupėje, jo galimą ryšį su RA ligos aktyvumu ir kitais klinikiniais rodikliais.

1.4. Tyrimo hipotezė ir ginamieji teiginiai

Tyrimo hipotezė – blogesni RA klinikiniai rodikliai sietini su mažesne vidutine vitamino D koncentracija sergančiųjų kraujyje, kurią gali lemti *VDR* geno polimorfizmai ar vitamino D atsako genų promotoriaus DNR metilinimo lygis, ir sunkesnis lėtinis periodontitas.

1. Vitamino D trūkumas yra paplitęs tarp sergančiųjų RA ir susijęs su didesniu RA ligos aktyvumu ir blogesniais fizinės sveikatos rodikliais.

2. *VDR* geno polimorfizmai ir *VDR*, *CYP2R1*, *CYP24A1* DNR metilinimo lygis netiesiogiai lemia vitamino D kiekį sergančiųjų RA organizme.
3. Lėtinis periodontitas yra dažnai diagnozuojama lėtinė infekcija sergantiesiems RA. Lėtinio PD sunkumas koreliuoja su didesniu RA ligos aktyvumu, didesniais uždegiminiais rodikliais bei mažesniu vitamino D kiekiu kraujo serume.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Reumatoidinis artritas

Reumatoidinis artritas yra lėtinė uždegiminė liga, tipiška sukianti smulkių ir vidutinio dydžio sąnarių simetrišką artritą. Pirminis pažeidimas pasireiškia sinovitu, kurio metu imuninės sistemos ląstelės invazuoja sąlyginai neląstelinę sinoviją ir sukelia palaipsnių hiperplazinio, invazinio audinio – *pannus* formavimąsi. Šis audinys sukelia kremzlės irimą, kaulo eroziją ir galiausiai pažeistų sąnarių funkcijos sutrikimą [24]. Sisteminis kvėpavimo, širdies ir kraujagyslių ar hematopoetinės sistemos pažeidimas taip pat gali būti viena iš ligos išraiškų [24]. RA heterogeniškumas apima ir genetinius rizikos veiksnius bei autoantikūnų formavimąsi. Liga pagal reumatoidinio faktoriaus (RF) ir/ar antikūnų prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą (anti-CCP) buvimą yra skirstoma į seropozityvų arba seronegatyvų RA. Tai, kad teigiami anti-CCP, RF titrai ir C reaktyvaus baltymo (CRP) koncentracijos kilimas kai kuriems pacientams atsiranda keletą metų iki klinikinių simptomų pasireiškimo, rodo, jog pakitęs imuninis atsakas vystantis RA prasideda labai anksti [25–27].

2.1.1. Reumatoidinio artrito etiopatogenezė

Pastaruoju metu pateikiama vis daugiau duomenų, kad genetinių, epigenetinių ir aplinkos veiksnių sąveika yra siejama su padidėjusia RA išsivystymo rizika ir ligos patogenezė. Genetiškai predisponuoto asmens nuolatinis imuninis atsakas į nenustatytą antigeną sąlygoja autoimunogeniškumo formavimąsi [1]. Potencialūs artritogeniniai antigenai (įskaitant citrulinizuotus baltymus) stimuliuoja T ląstelių sąlygotą uždegiminį atsaką ir esant „palankiems“ rizikos veiksniams aktyvuoja RA vystymosi procesą. Pagrindiniai moksliniais tyrimais įrodyti RA rizikos veiksniai yra moteriškoji lytis, šeiminė RA anamnezė, „bendro epitopo“ (angl. „*shared epitope*“, SE) aleliai, esantys audinių suderinamumo komplekso (angl. *major histocompatibility complex*, MHC) II klasės regione, ekspozicija su tabako gaminiais, dulkelėmis, mikrobiomo ypatumai („vidinė aplinka“), infekcijos ir mitybos įpročiai [25, 28–31] (1 pav.).

Rūkymas ir RA. Rūkymas ir kiti veiksniai sukeltys stresą kvėpavimo takams (pvz., ekspozicija su dulkėmis) didina riziką sirgti RA, ypač asmenims, turintiems *HLA-DRB1*04* alelius. Sinerginis rūkymo ir *HLA-DRB1* alelių poveikis turi įtakos ir anti-CCP formavimuisi [32]. Tai įrodo ir faktas, kad rūkančiųjų bronchoalveolinio lavažo skystyje aptinkama citrulinizuotų baltymų. Aplinkos veiksniai, dirginantys kvėpavimo takus ir kitus gleivinių barjerus (pvz., periodonto audinius), per fermentą peptidilarginindeiminazę 4 (PPAD4) skatina potransliacines modifikacijas ir kokybiškai bei kiekybiškai keičia gleivinių baltymų citrulinizaciją [31]. Tolerancijos praradimas naujai susiformavusiems fibrinogeno, vimentino, kolageno, keratino ir α -enolazės citrulinizuotiems epitopams lemia anti-CCP gamybą [32].

Infekcijos ir žarnyno mikrobiomas. Įvairūs infekcijų sukėlėjai (Epšteino Baro virusas, citomegalovirusai, parvovirusas B19, *Escherichia coli* ir kt.) ir jų gaminami produktai dėl autoimunogeniškumo skatinimo taip pat siejami su RA [33]. Sergant infekcine liga susiformavę imuniniai kompleksai gali lemti RF produkciją (aukšto afiniteto autoantikūnus prieš imunoglobulino Fc fragmentą), kuris dalyvauja RA patogenezėje [31]. Pripažinta, kad virškinimo sistemos mikrobiomas taip pat daro įtaką imuninės sistemos funkcijai, o žarnyno disbiozė yra susijusi su RA patogenezė per T ląstelių liniją [34]. Sveikame organizme CD4+ ląstelių subpopuliacijoms (pagalbiniai T limfocitai (angl. *T helper*, Th) 17 ir T reguliacinės (Treg) ląstelės) yra būdingas balansas, kuris pasižymi priešuždegiminiu poveikiu ir apsaugo nuo autoimuninių procesų susidarymo. O RA atveju būna padidėjusi Th17 ir sumažėjusi Treg ląstelių raiška. Šį disbalansą gali nulemti žarnyno mikrobiomas, veikiantis per Toll 2 tipo receptorius [35].

Lėtinis periodontitas. Kita infekcinė liga, kuri manoma, kad gali turėti įtakos RA išsivystymui ir klinikinei eigai, yra lėtinis periodontitas. Atlikti epidemiologiniai tyrimai atskleidžia platų PD paplitimą tarp sergančiųjų RA, varijuojantį nuo 28 iki 85% pacientų, iš kurių 11–14% serga sunkiu lėtiniu PD [36–38]. Bendri imunopatogenetiniai ligų mechanizmai, lemiantys jungiamojo ir kaulinio audinio destruktiją, yra patognominiai abiejų ligų atveju. PD – tai infekcinės kilmės liga, kurią sukelia periodonto patogenai (*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Aggregatibacter actinomycetem-comitans* (*A. actinomycetem-comitans*), *Tannerella forsythia* ir kt.), sąlygojantys vietinį ir sisteminį imuninį atsaką, kurio metu netenkama jungties ir rezorbuojamas alveolinis kaulas [39]. Potencialų PD patogenų dalyvavimą RA etiopatogenezėje įrodo bakterijų DNR ir antikūnų

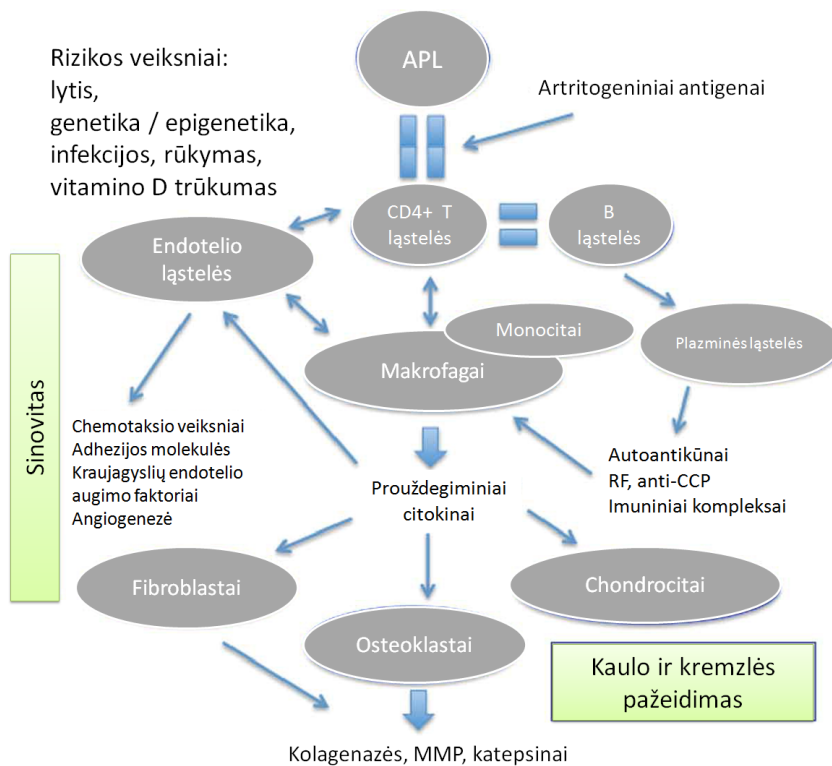
prieš jas identifikavimas RA sergančiųjų kraujo serume bei sąnarių sinovijos skystyje [16]. Taip pat yra žinoma, kad *P. gingivalis* išskiriamas fermentas PPAD4 lemia baltymų citrulinizaciją, t.y. peptidil arginino virtimą į peptidil citruliną ir autoantikūnų (anti-CCP) gamybą sergant RA [40]. Kitos PD patogeninės bakterijos *A. actinomycetem-comitans* sekretuojamas leukotoksinas A, indukuojantis šeimininko baltymų citrulinizaciją, keičia neutrofilų funkciją ir taip pat skatina RA autoantigenų citrulinizaciją [41]. Mikrobinė disbiozė ir jos sąlygoti uždegiminiai procesai stimuliuoja imuninių ląstelių atsaką produkuoti prouždegiminius citokinus (IL-6, IL-1 β , TNF- α , matrikso metaloproteinazes (MMP) ir kt.). Padidėjusi branduolio faktoriaus kappo B ligando receptorių (angl. *receptor activator of the nuclear factor kappa B ligand*, RANKL) aktyvatoriaus stimuliacija ir sutrikęs imuninis atsakas RA ir PD patogenezėje yra vieni esminių veiksnių, kliniškai pasireiškiančių kremzlės ir kaulo destrukcija bei dantis supančių audinių netekimu [40].

Mitybos įpročiai. Mitybos įpročiai gali veikti kaip apsauginiai arba RA riziką didinantys veiksniai, tai priklauso nuo konkretaus produkto savybių [29]. Pavyzdžiui, raudona mėsa, pieno baltymai, perteklinis kalorijų, druskos, cukraus vartojimas siejami su uždegimą skatinančiu poveikiu, gali lemti nutukimą, žarnyno disbiozę ir padidėjusią riziką sirgti RA. Žinoma, kad riebalinis audinys geba produkuoti prouždegiminius citokinus (interferoną- α , IL-6, CRP ir adipokinus), o padidėjusi uždegiminių citokinių produkcija sukuria tinkamą aplinką autoimunogeniškumui ir RA formavimuisi [42]. O Viduržemio jūros dieta, kurioje vyrauja riebi žuvis, gausiai vartojama polinesočiųjų riebalų rūgščių, vaisių, daržovių, turi priešuždegiminį poveikį, lemia mikrobiotos homeostazę, svorio kontrolę ir apsauginį poveikį sąnariams [29].

Vitaminas D. Kitas svarbus aplinkos veiksnys, pasižymintis imunomoduliacinėmis, priešuždegiminėmis savybėmis, yra vitaminas D, kuris organizme gali būti sintetinamas odą veikiant UV spinduliais arba gaunamas su maistu. Vitaminas D yra reikšmingas kaulinio audinio apykaitai, ląstelių diferenciacijai, pasižymi poveikiu genomui, o jo trūkumas siejamas su RA patogenezė [43].

Taigi RA yra polietiologinė, sudėtingos imunopatogenezės liga, kuria sergant skirtingos imuninės sistemos ląstelių populiacijos įtraukiamos į imunouždegiminį sisteminį ir lokalių atsaką [44]. T ir B ląstelių sąveika lemia autoantikūnų, t.y. RF, anti-CCP ir imuninių kompleksų, kurie dalyvauja ankstyvame RA vystymesi, hiperprodukciją. T ląstelių sukeltas imuninis

reaktyvumas sąlygoja kitų RA patogenezės kaskadoje svarbių uždegiminių ląstelių, t.y. monocitų, makrofagų, į fibroblastus panašių sinoviocitų, infiltruojančių sinovinį audinį, aktyvaciją ir proliferaciją [31]. Šių ląstelių aktyvacija pasireiškia padidėjusia uždegiminių citokinų (TNF- α , IL-6, IL-1, IL-17) ir vietinių augimo faktorių (pvz., kraujagyslių endotelio augimo faktorius, angl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), kurie lemia sinovinio audinio išvešėjimą ir sinovitą, gamybą [31]. Uždegiminių citokinų ir VEGF produkcija sukelia padidėjusią endotelio ląstelių aktyvaciją, adhezijos molekulių ir chemokinių raišką sinovijos audinyje, kurios toliau skatina uždegiminių ląstelių migraciją į sąnarį, taip pat vietinę angiogenezę [45, 46]. Galiausiai, aktyvuotų sinovijos makrofagų, fibroblastų ir osteoklastų sąlygota uždegiminių citokinų ir metaloproteinazių produkcija yra lemiamas veiksnys kremzlės ir kaulo irimo procese sergant RA [44] (1 pav.).



1 pav. Reumatoidinio artrito etiopatogenezės schema. APL – antigeną pateikiančios ląstelės; anti-CCP – antikūnai prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą; RF – reumatoidinis faktorius; MMP – metaloproteinazės. Adaptuota iš [44].

2.1.2. Reumatoidinis artritas ir genetiniai veiksniai

Genetinių veiksnių ir RA ryšį visų pirma įrodo šeiminė ligos anamnezė: pirmos eilės giminaičių rizika sirgti RA yra 1,5 karto didesnė nei bendros populiacijos, o monozigotinių dvynių atveju dažnis padidėja iki 12–15% [47–49]. Svarbiausi su RA rizika susiję aleliai randami šeštos chromosomos MHC II klasės audinių suderinamumo komplekso lokuse, koduojančiame amino rūgščių sekas, atitinkančias žmogaus leukocitų antigenus, HLA. Šie aleliai vadinami „bendru epitopu“ arba SE (nuo angl. *shared epitope*) [50]. Šis epitopas – tai penkių aminorūgščių (glutaminas-leucinas-argininas-alaninas-alaninas) motyvas (QKRAA, QRRAA arba RRRAA), esantis trečioje hipervariabilioje *HLA-DR β* grandinės srityje. Manoma, kad bendro epitopo alelių grupė sudaro apie 40% genetinių RA rizikos veiksnių [51], iš kurių pagrindiniai – *HLA-DRB1*01* ir *DRB1*04*, taip pat *HLA-DRB1*13*, *DRB1*15* ir kiti [51, 52]. *HLA-DRB1* SE aleliai išskirtinai yra susiję su anti-CCP seropozityviu RA, o SE nepriklausantys aleliai, kaip antai *HLA-DRB1*03* – su seronegatyvia artrito forma [53, 54]. Taip pat yra žinoma, kad *HLA-DRB1*04* variantas yra siejamas su sunkesne RA eiga ir labiau išreikštu sąnarių pažeidimu [51]. Manoma, kad daugiau kaip 90% RA sergančių pacientų turi bent vieną iš SE variantų. Yra svarių įrodymų, kad SE koduojantys *HLA-DRB1* aleliai (t.y. *DRB1*01*, *DRB1*04*, *DRB1*10* ir *DRB1*14*) yra susiję su citrulinizuotų autoantigenų pateikimu CD4+ T ląstelėms ir anti-CCP formavimusi [55, 56]. SE lokusas, manoma, formuoja T ląstelių veiklą, nukreiptą į autoreaktyvumą ir netolerogeniškumą. Tai ne tik pabrėžia CD4+ T ląstelių svarbą autoantikūnų gamyboje, bet ir įrodo pagrindinį T ląstelių (ypač pagalbinių T limfocitų) vaidmenį RA patogenezėje [57]. Intensyviai atliekamais viso genomo sekvenavimo tyrimais nustatyta daugiau kaip 100 ne HLA genetinių lokusų, susijusių su RA, tačiau tikslus juos su liga jungiančių genų polimorfizmų priežastingumas iki šiol nėra tiksliai žinomas [58, 59]. Pagrindiniai su RA siejami VNP yra *PTPN22*, *CTLA4*, *TRAF1*, *STAT4*, *IRF5*, *CCR6*, *IL23R*, *PADI4* ir kiti [60–66]. Didžioji dalis VNP variantų koduojamų produktų yra susiję su T ląstelių diferenciacija, aktyvacija, signalo perdavimu, antigenų citrulinizacija, taip pat aprašomas kumuliacinis skirtingų lokusų poveikis, sustiprinantis *HLA-DRB1* alelių įtaką (pvz., *PTPN22*, *HIPK1*, *CSDE1* genų variantai), ypač vertinant riziką sirgti seropozityviu RA [66, 67]. Visgi didžiosios ne HLA dalies nustatytų lokusų efektas RA yra mažas – šansų santykis (ŠS) sirgti padidėja 1,5–2 kartus, lyginant skirtingas populiacijas [48]. Esminiai su RA susiję genų lokusai ir jų veikimo mechanizmai pateikiami 1 lentelėje.

1 lentelė. Pagrindiniai genetiniai veiksniai, siejami su rizika sirgti RA [28]

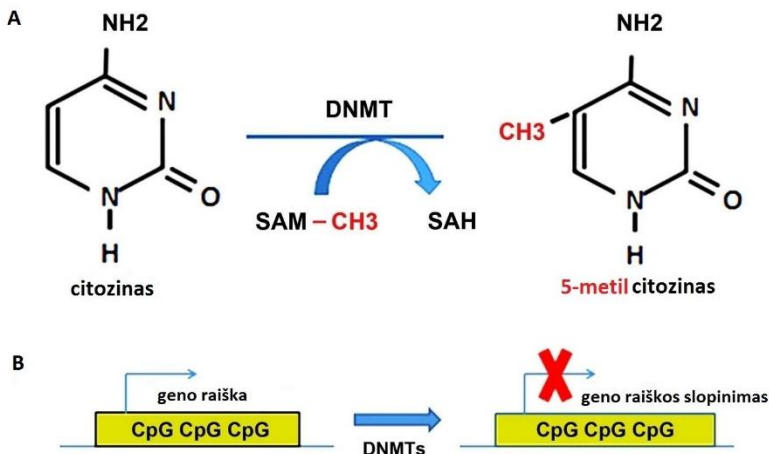
Genetinis regionas	Mechanizmas
MHC II klasės lokusai, koduojantys grupę HLA baltymų, įvardijamų kaip „bendras epitopas“	Citrulinintų antigenų pateikimas; intraląstelinis poveikis lemiantis padidėjusį uždegimą
Tirozino fosfatazės baltymas, ne-receptorinis tipas 22 (<i>PTPN22</i>)	Sisteminis ląstelinis hiperreaktyvumas; gali sutrikdyti <i>PTPN22</i> ir <i>PAD</i> sąveiką bei lemti hipercitrulinizaciją
IL-6 receptorius	Padidėjęs uždegiminis atsakas dėl sutrikusios IL-6 apykaitos
TNF receptoriaus -faktorius 1 (<i>TRAF1/C5</i>)	Padidėjęs uždegiminis atsakas
Signalo keitiklis ir transkripcijos aktyvatorius 4 (<i>STAT4</i>)	Padidėjęs uždegiminis atsakas
Peptidilarginindeiminazė 4 (<i>PPAD4</i>)	Padidėjusi citrulinizacija
Fc gama receptoriaus (<i>FCGR</i>)	Padidėjęs antigenų pateikimas
CD40, CC chemokino ligandas 21 (<i>CCL21</i>), CC chemokino receptoriaus 6 (<i>CCR6</i>)	Padidėjusi ląstelių aktyvacija ir uždegimas

2.1.3. Reumatoidinis artritas ir epigenetiniai veiksniai

Terminas „epigenetika“ siejamas su paveldimais genų raiškos pokyčiais, atsirandančiais nekeičiant genetinio kodo, t.y. pirminės DNR sekos [68]. Pagrindiniams epigenetiniams veiksniams priskiriamos histonų modifikacijos (acetilinimas, metilinimas, fosforilinimas ir kita), DNR modifikacijos (DNR metilinimas, hidrosimetilinimas ir demetilinimas) ir nekoduojančios reguliacinės ribonukleino rūgštys (RNR – trumposios ir ilgosios, nekoduojančios baltymo) [69–71]. Genų raiškos sutrikdymas, nulemtas epigenetinių modifikacijų gali turėti įtakos autoimuninių ligų, vėžio, neurologinių, endokrininių ir kitų ligų išsivystymui [72, 73]. Epigenetiniai pokyčiai, skirtingai nei genetiniai, gali būti grįžtami [74]. Svarbu paminėti, kad epigenetinėms modifikacijoms įtakos turi aplinkos veiksniai (pvz., rūkymas, vitaminas D, mitybos įpročiai, amžius ir kt.), dėl to epigenetika yra kaip dinaminis ryšys, jungiantis genotipą, aplinką ir fenotipo pasireiškimą [75, 76]. Epigenetika taip pat yra svarbi formuojant imuninės sistemos funkciją bei uždegiminį atsaką [77, 78], todėl šios mokslo srities tyrimai yra aktualūs

analizuojant, kodėl vieni genetiškai predisponuoti asmenys serga RA ar kita autoimunine liga, o kiti ne.

DNR metilinimas. Pastaruoju metu vis dažniau diskutuojama apie RA patogenezėje dalyvaujančias epigenetines modifikacijas, iš kurių daugiausiai tiriamas DNR metilinimas. Yra žinoma, kad DNR metilinimas reguliuoja genų raišką, turi įtakos kitiems svarbiems procesams, tokiems kaip genomo imprintingas, ląstelių diferenciacija, genų transkripcijos reguliavimas, X chromosomos inaktyvacija ir chromatino pertvarkymas [70]. DNR metilinimas – tai epigenetinė modifikacija, kurios metu fermentų šeimai DNR metiltransferazėms (DNMT) metilinant nukleobazę citoziną susiformuoja 5-metilcitozinas; modifikacijos vyksta genų promotoriuose, turinčiuose gausias citozino guanino dinukleotidų sankaupas („CpG salos“), taip pat kitose genų dalyse [79, 80]. DNMT katalizuojant procesą, citozino aromatinio žiedo penktosios anglies metilinimui kaip metilo grupės donoras yra naudojamas S-adenozilmetioninas (SAM) [81] (2 pav., A). Yra žinomos kelios DNMT, kurios atlieka skirtingas funkcijas: DNMT1 atsakinga už jau susiformavusio metilinimo palaikymą, o DNMT3a ir 3b – už *de novo* DNR metilinimą [82]. Įvykus metilinimui modifikuojama chromatino struktūra ir slopinama arba visai sustabdoma transkripcija, t.y. geno raiška (2 pav., B). Ir nors DNR metilinimas vyksta ir normalių fiziologinių procesų metu, tačiau tam tikrų genų metilinimo pokyčiai gali sąlygoti pakitusią genų transkripciją ir baltymų raišką, suintensyvėjusį uždegiminį atsaką ir ligos išsivystymą [83].



2 pav. DNR metilinimas. Citozino virtimas 5-metil citozinu katalizuojant fermentui DNR metiltransferazei (DNMT) (A). Geno raiškos slopinimas (B). CpG – citozino guanino dinukleotidas; SAM – S-adenozilmetioninas; SAH – S-adenozilhomocisteinas. Adaptuota iš [84].

Reumatoidinio artrito patogenezėje dalyvaujančios skirtingos ląstelių populiacijos, įskaitant periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles, T limfocitus, B limfocitus ir RA sinovijos fibroblastus (RASf), pasižymi skirtingais DNR metilinimo profiliais [85]. Atliktų skirtingų DNR metilinimo tyrimų rezultatai taip pat nevienodi ir priklauso nuo tirto ląstelių tipo. Visgi RA būdingesnis globalus DNR hipometilinimas, aptinkamas RA tiriamųjų T limfocituose, RASf bei periferinio kraujo ląstelėse [86].

Corvetta su bendraautoriais (1991 m.) buvo vieni pirmųjų nustatę periferinio kraujo ląstelių hipometilinimą RA, kuris buvo reikšmingai mažesnis palyginti su sveikų asmenų DNR metilinimo rezultatais [87]. Vėliau jo teiginių patvirtino ir kiti tyrėjai, neradę ryšio tarp metilo donoro molekulių (vitamino B₁₂, folatų ir piridoksalfosfatų) ir DNR metilinimo lygio RA pacientų plazmoje. Įdomu, kad gydymas metotreksatu visgi teigiamai veikė hipometilinimą [88]. 2011 m. atliktu tyrimu, RA hipometilintose periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse nustatyta padidėjusi *DNMT1* geno raiška [89]. Vėliau Liu su kolegomis, atlikę viso genomo DNR metilinimo analizę RA ir kontrolinės grupės periferinio kraujo ląstelėse, nustatė du *MHC* skirtingai metilintus regionus, svarbius genetinei RA predispozicijai [90]. Kitų, su padidėjusia RA rizika siejamų genų metilinimo profilis taip pat yra pakitęs. Žinoma, kad *IL-6* geno promotoriaus srities hipometilinimas, lemiantis aktyvią geno raišką, koreliuoja su padidėjusiais *IL-6* kiekiais RA sergančių pacientų kraujo serume palyginti su kontrolinių grupių kraujo serumu [91]. *IL-6* taip pat koreliuoja su *STAT3*, geno, svarbaus RA predispozicijai, lokusų hipometilinimu [92]. Priešingai – genas, koduojantis *DUSP22*, RA ligonių T limfocituose yra hipermetilintas. *DUSP22* yra fermentas tirozino fosfatazė, kuri neigiamai veikia *IL-6* transkripcijos veiksnį *STAT3* ir lemia padidėjusią jo raišką [93]. Be periferinio kraujo ląstelių DNR metilinimo pokyčių, plačiai tiriamos ir RASf ląstelių kultūros.

RA sinovijos fibroblastai yra vienos pagrindinių RA uždegimą palaikančių ląstelių, kurioms būdingas agresyvus, proliferuojantis fenotipas. RASf produkuoja uždegiminius citokinus ir chemokinus, kurie pritraukia ir aktyvina kitas imuninės sistemos ląsteles bei sąlygoja kremzlės ir kaulo irimą sergant RA, skatindamos matriksą degraduojančių fermentų raišką. RASf epigenetiniai pokyčiai geriausiai įrodo epigenominių modifikacijų įtaką RA patogenezei [94, 95]. RASf DNR metilomas skiriasi nuo osteoartrito sinovijos fibroblastų (OASf) metilomo ir lemia išskirtinai patogeninę RASf funkciją. Pirmieji atlikti tyrimai įrodė, kad RASf pasižymi globaliu hipometilinimu [96]. Tai ypač atsispindėjo genuose, atsakinguose už ląstelių

migraciją, adheziją, tarpląstelinio užpildo sąveiką [97]. Svarbu paminėti, kad RASF yra sumažėjusi DNMT1 raiška palyginti su OASF. Tai galėtų paaiškinti globalaus RASF hipometilimo priežastis [96]. Visgi kitų genų epigenetinis aktyvumas skiriasi, pavyzdžiui, hipermetilintas *DR3* sukelia sinovijos fibroblastų aktyvaciją sergant RA ir, manoma, prisideda prie jų rezistentiškumo apoptozei [98]. O hipometilintas *CXCL12* lemia padidėjusią MMP raišką ir sąnarių pažeidimą sergant RA [99].

Be atskirų genų promotorių metilinimo tyrimų, atliekami ir viso genomo RASF metilinimo tyrimai. Nakano ir kolegų atlikta analizė atskleidė net 1859 skirtingai metilintus lokusus. Su RA susijęs hipometilinimas nustatytas *CHI3L1*, *CASP1*, *STAT3*, *MAP3K5*, *MEFV* ir *WISP3* genų sekose, o hipermetilinimas stebėtas *TGFBR2* ir *FOXO1* genuose [15]. Neseniai atlikti sergančių RA ir kontrolinės grupės asmenų periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių ir B limfocitų viso genomo epigenetiniai tyrimai taip pat identifikavo nemažą kiekį skirtingai metilintų genų, galinčių turėti įtakos RA patogenezėi [100, 101]. Epigenetiniais pokyčiais galima paaiškinti ir padidėjusią moteriškosios lyties atstovių riziką sirgti RA. X chromosomoje koduojamo *CD40L* geno demetilinimas vyko išskirtinai tik moterų, o ne vyrų CD4+ T limfocituose. RA sergančioms moterims būdinga sutrikusi X chromosomos inaktyvacija [102]. Akivaizdu, kad epigenetiniai pokyčiai RA patogenezėje atlieka svarbų vaidmenį ir tebėra intensyvių tyrimų objektas.

2.2. Vitaminas D

Vitaminas D yra riebaluose tirpus sekosteroidas, kurio žmogaus organizmas gauna su maistu (ypač jo gausu žuvyje, kiaušiniuose, kt.) arba veikiant saulės UV spinduliams B (bangos ilgis 290–315 nm) per odą [103, 104]. Vis dėlto maistas sudaro tik 5 % viso vitamino D šaltinių, o pagrindinė šio vitamino sintezė vyksta odoje iš pirmtako 7-dehidrocholesterolio, kuris perėjęs UV spinduliuotės terminę izomerizaciją generuojamas į parenterinį vitaminą D₃, t.y. cholekalciferolį [104, 105]. Pradžioje buvo įrodyta sąsaja tarp vitamino D ir kaulų mineralizacijos bei kalcio apykaitos, o vitamino D trūkumas susietas su rachitu [106]. Vėliau atrasti ir kiti biologiniai vitamino D efektai įgytos ir įgimtos imuninės sistemos funkcijai, ląstelių diferenciacijai, jo pleotropinis poveikis. Pastaruoju metu vitamino D trūkumas yra siejamas ir su autoimuninių ligų, įskaitant skydliaukės ligas, cukrinį diabetą, išsėtinę sklerozę, reumatoidinį artritą ir kt., patofiziologija [107]. Vis dėlto mechanizmai, kuriais vitaminas D veikia autoimunitetą nėra iki galo iširti,

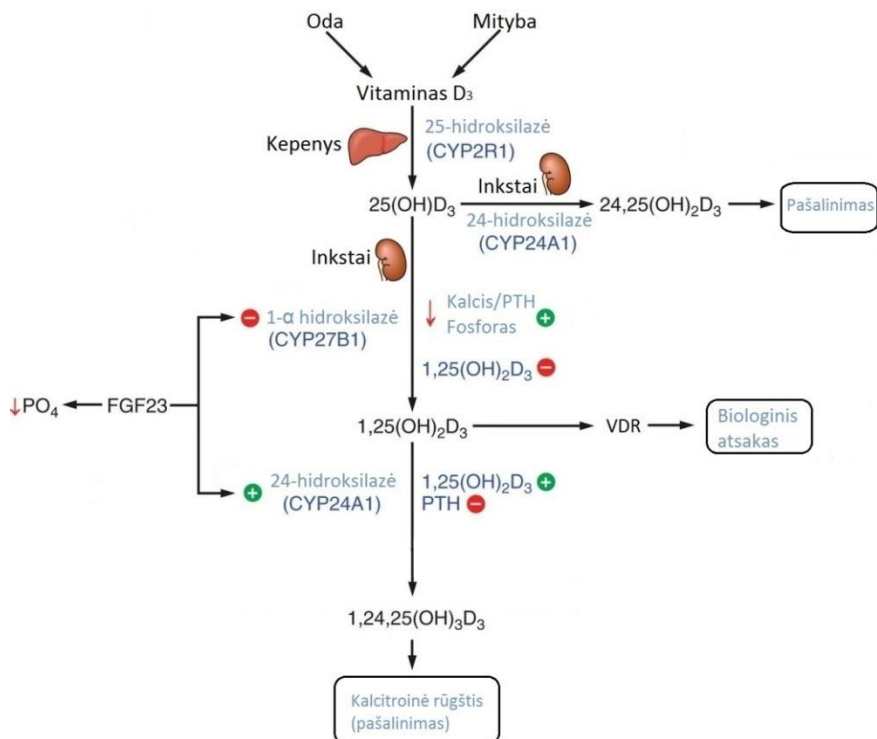
taip pat lieka neaišku, ar vitamino D trūkumas yra ligos patogenezėje dalyvaujantis veiksnys, ar ligos progresavimo ir sunkumo žymuo.

2.2.1. Vitamino D apykaita

Žmogaus organizmas vitamino D gali gauti dviem formomis: vitamino D₂ (ergokalciferolis) ir vitamino D₃ (cholecalciferolis), kurie tarpusavyje skiriasi dvigubų anglies jungčių skaičiumi ir pozicijomis. Žinoma, kad vitaminui D₂, turinčiam tik dvi anglies jungtis, būdingas blogesnis afinitetas vitaminą D surišančiam baltymui ir sumažėjęs bioprieinamumas. Todėl cholecalciferolis yra pagrindinė žmogui aktuali vitamino D forma [108].

Kadangi cholecalciferolis yra biologiškai inertiškas, t.y. neveiklus, tam, kad taptų metaboliškai aktyvus, vitaminas D organizme turi pereiti kelis fermentinius hidroksilinimo ir nefermentinius procesus (3 pav.). Pirmiausia, vitaminas D ir jo metabolitai, susijungę su vitaminą surišančiu baltymu transportuojami į kepenis, kur vyksta pirmasis hidroksilinimas dalyvaujant citochromo P450 šeimos fermentui 25-hidroksilazei (CYP2R1) [109]. Susidaręs produktas 25-hidroksicholecalciferolis (25(OH)D₃), arba kalcidiolis, toliau transportuojamas į inkstus, kur veikiant fermentui 1- α hidroksilazei (CYP27B1) konvertuojamas į biologiškai aktyvų kalцитriolį (1,25(OH)₂D₃). Didžiausia CYP27B1 raiška būna inkstų proksimalinių kanalėlių ląstelėse, todėl daugiausia cirkuliuojančio kalцитriolio susidaro būtent inkstuose [110]. Tačiau, CYP27B1 raiška yra būdinga ir imuninės sistemos ląstelėms (dendritinėms ląstelėms, makrofagams, T ir B limfocitams), kurios taip pat geba produkuoti 1,25(OH)₂D₃, dalyvaujantį įvairiuose parakrininiuose ir autokrininiuose ląstelių procesuose [111, 112]. Kalцитriolio kiekis organizme reguliuojamas dalyvaujant fermentui 24-hidroksilazei (CYP24A1), kuris gali katabolizuoti kalcidiolį ir patį kalцитriolį į neaktyvius metabolitus – 24,25 dihidroksicholecalciferolį ir 1,24,25 trihidroksicholecalciferolį. Pastarieji yra pašalinami su šlapimu arba tulžimi. Taigi esant balansui tarp fermentų 1- α hidroksilazės ir 24-hidroksilazės bei fibroblastų augimo faktoriaus 23 (angl. *fibroblast growth factor 23*, FGF23) ir parathormono (PTH), kurie taip pat yra svarbūs 1- α hidroksilazės aktyvumui, apibrėžiamas aktyvios vitamino D formos kiekis. Žinoma, kad inkstuose 1- α -hidroksilazę aktyvina PTH ir fosforo kiekio sumažėjimas, o slopina kalcis ir pats kalцитriolis bei osteocitų gaminamas FGF23 [113, 114]. Dėl trumpo gyvavimo pusperiodžio, kalцитriolio koncentracija nėra matuojama norint įvertinti vitamino D kiekį organizme. Tam dažniausiai atliekami 25(OH)D₃ tyrimai. Ir nors iki šiol nėra aiškaus sutarimo dėl optimalaus vitamino D kiekio sergant tam tikromis ligomis ir sveikam

žmogui, tačiau manoma, kad $25(\text{OH})\text{D}_3$ koncentracija, kuri yra tarp 30 ir 50 ng/ml (75 – 125 nmol/l), gali būti nepakankama tam tikroms asmenų grupėms (pvz., sergant osteoporoze, vartojant gliukokortikoidus, esant malabsorbicijai ir kt.), o optimalus vitamino D kiekis kraujo serume turėtų būti daugiau kaip 50 ng/ml (>125 nmol/l) [115]. Visgi, remiantis Holick ir bendraautorių rekomendacijomis, >30 ng/ml (>75 nmol/l) vitamino D koncentracija vertinama kaip normali [116].

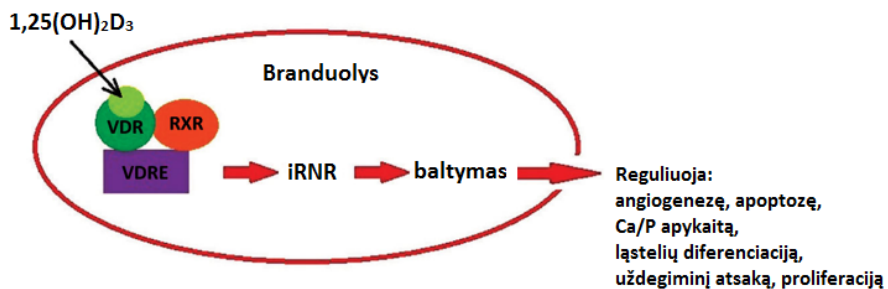


3 pav. Vitamino D apykaita. FGF23 – fibroblastų augimo faktorius 23; PTH – parathormonas; VDR – vitamino D receptoriaus. Adaptuota iš [186].

Kaip minėta, aktyvi vitamino D forma kalcitriolis ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) dalyvauja kalcio ir fosforo homeostazėje, taip pat yra svarbus įgimtos ir įgytos imuninės sistemos modulatorius [117]. Kalcitriolio biologinis aktyvumas pasireiškia jungiantis prie VDR, kuris priklauso branduolio hormonų receptoriaus superšeimai [118]. Kalcitriolis gali veikti genominiu ir negenominiu būdais, tai priklauso nuo VDR lokalizacijos. Genominio mechanizmo veikimo metu intraląstelinis VDR, susijungęs su $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, heterodimerizuojasi su retinoinės rūgšties X receptoriu, šiam kompleksui patekus į ląstelės branduolį per genų promotoriuose ir kitose dalyse esančius vitamino D atsako

elementus (angl. *vitamin D responsive elements*, VDRE) VDR veikia kaip transkripcijos faktorius ir aktyvuoja arba slopina vitaminui D jautrių genų raišką [119] (4pav.). Manoma, kad vitaminas D tiesiogiai ir netiesiogiai turi įtakos apie 5% viso žmogaus genomo ir reguliuoja 36 skirtingų ląstelių tipų veiklą [120]. Genų ontologijos analizė nustatė 11031 VDR geną taikinį, kurių produktai yra svarbūs organizmo metaboliniuose procesuose (43%), ląstelių ir audinių morfologijoje (19%), ląstelių sukibime (10%), diferenciacijoje ir vystymesi (10%), angiogenezėje (10%) ir kt. procesuose [120, 163]. Žinoma, kad vitamino D atsako elementai buvo nustatyti ir *HLA-DRB1* geno, svarbaus RA genetinei predispozicijai, promotoriaus srityje. Vadinasi, kalcitriolis, veikdamas per VDR genomino signalo reguliacinius mechanizmus, gali turėti įtakos ir *HLA-DRB1* raiškai [177].

Imunomoduliacinis, negenomnis vitamino D poveikis vyksta kalcitrioliui tiesiogiai jungiantis su VDR, esančiu ląstelių paviršiuje. Be kitų organizmo ląstelių (smegenų, prostatos, krūčių, žarnyno ir kt.), VDR raiška vyksta ir daugelyje imuninės sistemos ląstelių, įskaitant monocitus, makrofagus, dendritines ląsteles, neutrofilus, T ir B limfocitus. VDR aptinkama ir RA pažeistų sąnarių chondrocituose ir sinoviocituose [120,121]. Jungdamasis per VDR, vitaminas D reguliuoja imuninės sistemos ląstelių brendimą, apykaitą, antigeno pateikimą, taip pat atsaką į citokinų ir chemokinų gamybą [122]. Pateikti duomenys dar labiau sustiprina vitamino D ir autoimuninių ligų patofiziologinį ryšį.



4 pav. Genominis vitamino D poveikis. Ca – kalcis; iNRR – informacinė ribonukleorūgštis; P – fosforas; RXR – retinoinės X rūgšties receptoriai; VDR – vitamino D receptoriai; VDRE – vitamino D atsako elementai. Adaptuota iš [174].

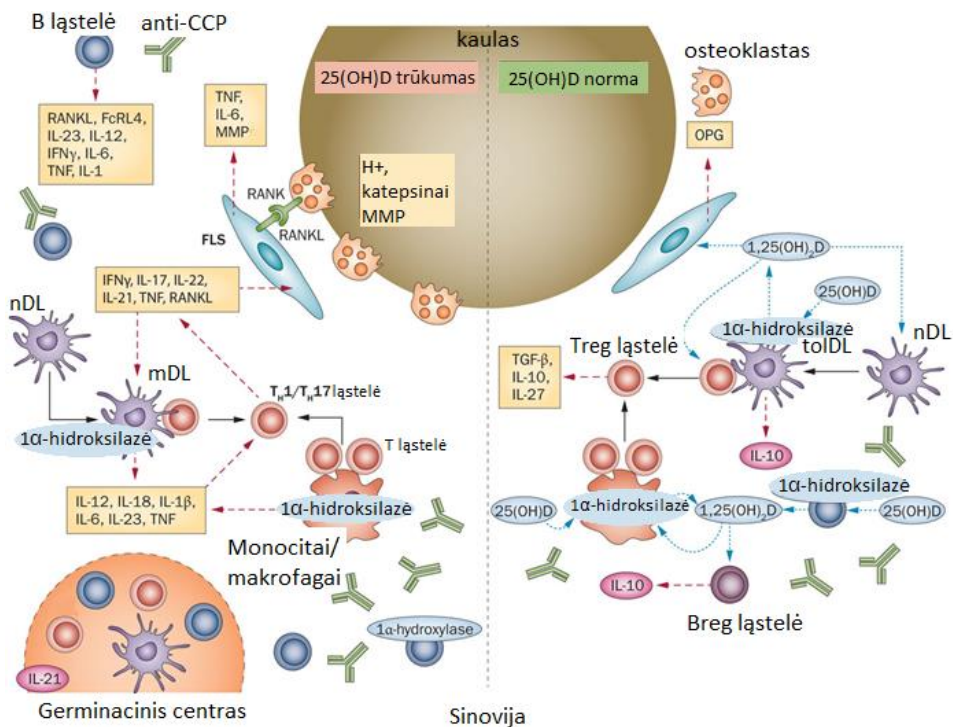
2.2.2. Vitaminas D ir reumatoidinis artritas

Vienas pirmųjų vitaminą D ir RA siejančių įrodymų buvo VDR receptorių identifikavimas RA sergančių pacientų T limfocituose [123]. RA patogenezėje dalyvauja imuninės sistemos ir stromos ląstelės, kurių sąlygojamas nuolatinis uždegiminis atsakas lemia sąnario destruktiją ir balanso tarp kaulą formuojančių osteoblastų ir, priešingai, jų ardančių osteoklastų sutrikdymą. T ląstelės, makrofagai ir RASF yra pagrindinės patogenezėje dalyvaujančios ląstelės, tačiau ne mažiau svarbios yra ir dendritinės ląstelės ir B limfocitai [124]. CD4⁺ T pagalbinės ląstelės yra pagrindinės dalyvės antigeni-specifinio įgyto atsako formavimuisi. Uždegiminiame audinyje – RA atveju sinovijoje – tiek makrofagai, tiek dendritinės ląstelės, RASF, B limfocitai ir osteoklastai yra kaip antigeną pateikiančios ląstelės ir skatina citokinų gamybą [124]. Šios ląstelės yra ir vitamino D taikiniai. Vitaminas D, stabdydamas dendritinių ląstelių diferenciaciją ir brendimą, pagerina jų tolerogeninę būklę ir mažina prouždegiminių citokinų, svarbių RA patogenezei (IL-6, IL-12, IL-23 ir TNF- α) sintezę, didina priešuždegiminių citokinų gamybą (IL-8, IL-10) bei mažina MHC I ir II klasės CD40, CD80, CD83, CD86 molekulių raišką [125]. Taigi 1,25(OH)₂D₃ skatina nebrandžių, tolerogeninių dendritinių ląstelių fenotipą, mažina antigeno pateikimą T ląstelėms, jų aktyvaciją ir autoimunogeniškumą. Veikdamas įgytos imuninės sistemos ląsteles, kalcitriolis slopina B ląstelių diferenciaciją į plazmines ląsteles, taip pat antikūnų gamybą. Pradžioje buvo manyta, kad vitaminas D veikia tik T ir B limfocitų proliferaciją, tačiau šiuo metu yra žinomas ir T limfocitų fenotipą reguliuojantis kalcitriolio poveikis. Vitaminas D slopina uždegiminį citokiną IL-17 gaminančių CD4⁺ T pagalbinių ląstelių Th17 ir Th1 raišką, taip skatindamas Th2 ir reguliacinių T limfocitų diferenciaciją bei uždegimo slopinimą [122, 126, 127]. Slopindamas T limfocitų proliferaciją mažina ir IL-2, IFN- γ sekreciją [128]. Kaip minėta anksčiau, Th1 ir Th17 ląstelių populiacijos yra patogeninės RA [129]. Vis dėlto didžioji dalis tyrimų, vertinančių vitamino D įtaką cirkuliuojančioms T ląstelėms, yra atlikti naudojant sveikų donorų kraują. 2018 m. Jeffery ir kolegų atliktame tyrime, iš sergančiųjų RA uždegiminio sąnario sinovijos skysčio išskirtiems T limfocitams buvo būdingas sąlyginis nejautrumas 1,25(OH)₂D₃, nepaisant aktyvios VDR raiškos, būtinos kalcitriolio signalo keliui [130]. Greičiausiai tai iš dalies yra susiję su sumažėjusiu sinovijos skysčio atminties T ląstelių atsaku į vitamino D poveikį, palyginti su periferinio kraujo T ląstelėmis [130]. Remiantis šiais duomenimis, manoma, kad imunomoduliacinis vitamino D poveikis uždegiminiam audiniui gali būti pakitęs dėl ląstelių taikinių nejautrumo

vitaminui D. Tokiu atveju periferinio kraujo ląstelių tyrimai gali tik iš dalies paaiškinti imunomoduliacinį vitamino D poveikį RA. Visgi manoma, kad didesnių vitamino D dozių vartojimas sergantiems RA galbūt galėtų pagerinti uždegiminių audinių jautrumą vitaminui D [124].

Be jau aprašyto poveikio imuninės sistemos ląstelėms, vitaminas D gali veikti ir RASF funkcijas. Ištirta, kad dėl vitamino D poveikio slopinama RASF gaminamų uždegimo mediatorių TNF- α , IL-6 ir MMP produkcija, be to, trukdydamas aktinui persitvarkyti vitaminas D galbūt mažina RASF invaziškumą [131], keičia osteoprotegerino/RANKL santykį ir slopina RASF sąlygotą osteoklastų aktyvaciją. Sinerginis IL-1 β ir 1,25(OH) $_2$ D $_3$ poveikis eksperimentinėms sinoviocitų linijos MH7A ląstelėms lemia IL-6, TNF- β , taip pat Th17 išskiriamų citokinų (IL-1 β , IL-6, IL-23) sumažėjusią produkciją, taip įrodydamas sinerginį vitamino D reguliacinį poveikį T ląstelių fenotipui [132]. Kiti su MH7A ląstelėmis atlikti tyrimai taip pat parodė, kad vitaminas D gali turėti įtakos sinoviocitų apoptozei, tačiau šis poveikis buvo tik skiriant 1,25(OH) $_2$ D $_3$ ir TNF- α kombinaciją kartu [133]. Apibendrinant – pateiktos įžvalgos leidžia daryti prielaidą, kad prieš uždegiminis vitamino D poveikis yra stipriausias, kai pažeidžiama imuninio atsako suaktyvinimo riba ir pradedami gaminti citokinai. Uždegiminėje aplinkoje vitaminas D veikia kaip grįžtamojo ryšio reguliatorius, mažinantis uždegiminį imuninį atsaką [122]. Taigi atlikti RA patogenezėje dalyvaujančių ląstelių kultūrų tyrimai su tam tikromis išimtis įrodė jų jautrumą vitaminui D poveikiui, skatinančiam prieš uždegiminį atsaką, mažinančiam RASF ir osteoklastų aktyvumą bei kremzlės ir kaulo destrukciją sergant RA. Vitamino D poveikis sinovijos ląstelių funkcijai detaliam pav. 5 pav.

Vis dėlto, sergant RA, teigiamas vitamino D poveikis sutrikus imuninės sistemos veiklai yra ribotas dėl nustatyto didelio vitamino D trūkumo paplitimo šioje pacientų grupėje [134, 135]. Vitamino D trūkumas siejamas su padidėjusia RA ligos išsivystymo rizika, didesniu ligos aktyvumu ir blogesne gyvenimo kokybe bei fizine sveikata, tačiau tyrimų rezultatai šiais klausimais skiriasi.



5 pav. Vitamino D kiekio poveikis imuninės sistemos ląstelių funkcijai. Anti-CCP – antikūnai prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą; Breg – B reguliacinė ląstelė; FLS – į fibroblastą panašus sinoviocitas; IL – interleukinas; IFN – interferonas; mDL – mieloidinė dendritinė ląstelė; MMP – metaloproteinazės; nDL – nesubrendusi dendritinė ląstelė; OPG – osteoprotegerinas; RANKL – branduolio faktoriaus kappa B ligando receptorių aktyvatorius; toDL – tolerogeninė dendritinė ląstelė; Treg – T reguliacinė ląstelė; TNF – naviko nekrozės faktorius. Adaptuota iš [124].

Vitamino D papildų vartojimas ir rizika sirgti RA. Merlino ir kolegų atliktas prospektyvinis Iowa‘os (JAV) moterų tyrimas nustatė, kad vartojant daugiau vitamino D papildų 34 % sumažėja rizika sirgti RA. Tyrimas vyko 11 metų ir jo metu buvo nustatyti 156 nauji RA atvejai. Deja, bet autoriai nevertino UV spinduliuotės poveikio, vykstant tyrimui nebuvo matuota ir vitamino D koncentracija serume [136]. Atlikta metaanalize, įvertinusia trijų didelių imčių rezultatus, taip pat buvo nustatyta 24,2 % mažesnė RA išsivystymo rizika asmenims, didesnėmis dozėmis vartojusiems vitamino D papildus [137]. Vis dėlto didesnė dalis tyrimų teigia, kad ryšio tarp papildų vartojimo ir rizikos susirgti RA nėra [138–140]. 2016 m. publikuotas Korėjos

mokslininkų tyrimas, analizavęs 19 metų ir vyresnių korėjiečių moterų turimą vitamino D kiekį, ryšio su RA išsivystymu nerado [140]. Tyrėjai, lyginę besimptomų asmenų, turinčių teigiamus RA autoantikūnus, ir seronegatyvių kontrolinės grupės asmenų vitamino D mėginius, reikšmingų skirtumų ir padidėjusios rizikos sirgti RA taip pat nenustatė [141]. Galimą vitamino D papildų vartojimo ir RA rizikos ryšį yra sunku paaiškinti dėl to, kad UV spinduliuotės sąlygota vitamino D gamyba ir iš mitybos šaltinių gaunamas vitaminas D nevisada koreliuoja su serumo 25(OH)D kiekiu. Kadangi RA yra polietiologinė liga, be aplinkos veiksnių, didelę įtaką turi ir genetinė predispozicija, todėl vertinti vien tik vitamino D įtaką yra klaidinga.

Vitamino D kiekio ir RA aktyvumo ryšys. Kol kas vienas stipriausių RA ir vitamino D siejančių atradimų yra jo ryšys su ligos progresavimu. 2015 m. atliktas tyrimas parodė, kad ankstyvo RA metu nustatyta maža vitamino D koncentracija buvo susijusi su mažesniu remisijos dažniu, didesniu ligos aktyvumu ir prastesniu atsaku į gydymą, palyginti su pacientais, kuriems nustatyta >20 ng/ml vitamino D koncentracija [142]. Panašios įžvalgos apie vitamino D trūkumo ryšį su RA ligos aktyvumu ir neįgalumo rodikliais buvo aprašytos ir kituose didelės imties Europos ir Japonijos mokslininkų tyrimuose [143, 144]. Hong su bendraautoriais savo tyrimo metu įrodė, kad RA sergantiems pacientams buvo būdinga maža vitamino D koncentracija, kuri neigiamai koreliavo su cirkuliuojančių uždegimo mediatorių IL-17 ir IL-23 kiekiu ir RA sąlygotu kaulo netekimu [145]. Kitas didelės apimties apžvalginis straipsnis nagrinėjo vitamino D ir įvairių ligų išėtis. Apibendrinus 107 sisteminių apžvalgų, 74 stebėjimo tyrimų metaanalizių, 87 atsiktinių imčių kontroliuojamų tyrimų metaanalizių duomenis, nustatytas neginčijamas vitamino D ir RA ligos aktyvumo ryšys [146]. Vis dėlto duomenys prieštaringi, nes kai kurių tyrimų, vertinusių ligos aktyvumo rodiklius ir vitamino D kiekį metu, reikšmingų sąsajų nebuvo aptikta [147–150]. Kita vertus, vitamino D ir ligos aktyvumo priežastingumą sunku vertinti, nes RA sergantys pacientai neretai turi judėjimo atramos sistemos funkcijos nepakankamumą, kuris mažina pacientų mobilumą ir galimybes UV spinduliuotės metu gaminti parenterinį vitaminą D. Rezultatams taip pat, įtakos gali turėti mitybos įpročiai, vitamino D trūkumo paplitimas bendrojoje populiacijoje ir skiriamas RA gydymas [151]. Visgi yra ir kita hipotezė, teigianti, kad mažas vitamino D kiekis sergant RA gali būti lėtinio uždegiminio atsako pasekmė: vitaminui D veikiant kaip aktyvios fazės baltymui, gali mažėti jo koncentracija. Tokiu atveju, vitamino D trūkumas tampa aktyvaus uždegimo, o ne ligos aktyvumo rodikliu [152].

Vitamino D papildų nauda sergantiesiems RA. Vienas iš pagrindinių RA gydymo tikslų yra sumažinti uždegiminį procesą ir skausmą [153]. Skausmo kilmė sergant RA gali būti sąlygota uždegimo, struktūrinių pokyčių ar pokyčių centrinės kilmės skausmo procesuose [154]. Kaulų ir raumenų sistemos skausmas yra susijęs su vitamino D trūkumu ir gali būti sėkmingai moduluojamas skiriant vitamino D papildus [155, 156]. Vertinant jau aptartą imunomoduliacinį poveikį imuninės sistemos ląstelėms, vitamino D papildų skyrimas gali būti naudingas ir gydant RA pacientus. Dvigubai aklo atsitiktinių imčių placebo kontroliuojamo klinikinio tyrimo metu pacientams, sergantiems ankstyvu RA, prie tradicinio gydymo skyrus vienkartinę 300 000 TV cholekalciferolio dozę, bendra jų sveikatos būklė pagerėjo. Tyrimo pradžioje išmatuota 16 ± 4 ng/ml vitamino D serumo koncentracija gydymo fone pakilo iki $28 \pm 4,3$ ng/ml [157]. Kito panašaus dizaino tyrimo metu pacientams, sergantiems aktyviu RA, skirtas kassavaitinis gydymas 50 000 TV cholekalciferoliu kartu su metotreksatu, trukęs 12 savaičių, nesumažino DAS28 (angl. *Disease Activity Score*) ligos aktyvumo, nors serumo vitamino D koncentracija gydymo metu ir pakilo. Reikia paminėti, kad gydymo pradžioje tiek sergantieji RA, tiek kontrolinės grupės asmenys turėjo pakankamą vitamino D serumo kiekį [158]. 2017 m. aprašytas 3 mėnesius trukęs tyrimas, kurio metu aktyviu RA sergantiems pacientams kartu su tradiciniais sintetiniais ligą modifikuojančiais vaistais (LMV) skirtas vitaminas D (po 60 000 TV kas savaitę 6 sav., vėliau tęsiant gydymą 1 kartą per mėnesį), gydymo fone pasiekė statistiškai reikšmingą ligos aktyvumo (DAS28) sumažėjimą palyginti su tyrimo pradžia [159]. Lourdudoss ir kolegų atliktu ankstyvo RA tyrimu nustatyta, kad didesnis su maistu gaunamo vitamino D kiekis prieš gydymą ligą modifikuojančiais vaistais lėmė geresnę Europos priešreumatinės lygos (angl. *European League Against Rheumatism*, EULAR), vertintą pagal DAS28 ligos aktyvumą, gydymo atsaką (ŠS 1,8 (95% PI 1,14–2,83)), paskyrus LMV [160]. Tyrimų rezultatai skiriasi dėl studijų heterogeniškumo: tyrimo dizaino, tiriamųjų imčių, vertinamų skirtingų tiriamųjų charakteristikų, ligos aktyvumo, vitamino D kiekio įtraukimo į tyrimą metu, vitamino D papildų dozės, gydymo trukmės ir kitų veiksnių. Taip pat stebėjimo tyrimų rezultatai yra ne tokie patikimi kaip atsitiktinių imčių klinikinių tyrimų. Visgi vitaminas D yra sąlyginai nebrangi ir saugi priemonė, galinti turėti teigiamą įtaką gydymo efektyvumui, vartojant kartu su RA skiriamais LVM [161]. Svarbu paminėti, kad vitamino D papildų efektyvumą gali lemti ir skirtingi vitamino D surišančio baltymo kiekiai bei genetiniai vitamino D apykaitą lemiantys veiksniai [162].

2.2.3. VDR genas ir jo polimorfizmai

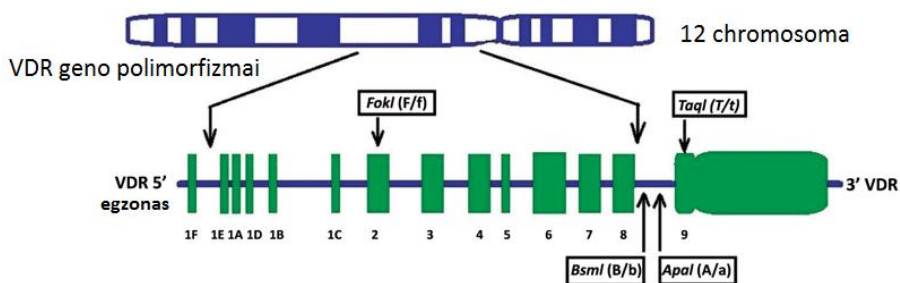
Vitamino D receptorių yra koduojamas *VDR* geno, kuris lokalizuotas 12 chromosomos 12q13.11 srityje ir sudarytas iš 11 egzonų. Trys iš jų formuoja 5' nekoduojantį regioną, o likę 8 atsakingi už *VDR* produktą. *VDR* geną sudaro apie 100 000 bazių porų, iš kurių tik apie 4600 koduoja *VDR* [164]. *VDR* genas turi platų promotoriaus regioną, galintį generuoti daug audiniams specifinių transkripcijos veiksnių [165].

Yra žinoma, kad patį *VDR* geną reguliuoja tokie veiksniai kaip amžius, aplinka (dieta, saulės ekspozicija, užterštumas, infekcijos). Didžioji dalis šių veiksnių dalyvauja *VDR* reguliacijoje ir daro įtaką vitamino D kiekiui. Be kitų reguliacijoje dalyvaujančių veiksnių yra įvardijamos ir epigenetinės modifikacijos (DNR metilinimas, histonų modifikacijos, nekoduojančios RNR), genetinė *VDR* promotorių, stiprintuvo sekų ir polimorfizmų reikšmė [163]. Įrodyta, kad tam tikrų genetinių polimorfizmų ir aplinkos sąveika, veikdama vitamino D kiekį, taip pat dalyvauja *VDR* autoreguliacijoje. Pavyzdžiui, cirkuliuojančio vitamino D kiekis yra tiesiogiai susijęs su cholesterolio sintezėje dalyvaujančio geno *DHCR7* polimorfizmais, taip pat hidroksilinimui svarbių *CYP2R1*, *CYP24A1* genų variantais [163]. 2020 m. publikuotoje sisteminėje apžvalgoje aprašyti net 35 genų variantai, galintys turėti įtakos vitamino D kiekiui, tarp kurių įvardijami ir *VDR* polimorfizmai [166].

Genetiniai, arba vieno nukleotido, polimorfizmai apibrėžiami kaip paveldimi genų sekos pokyčiai, pasireiškiantys daugiau kaip 1% populiacijos ir galintys turėti įtakos genų raiškai bei funkcijai [167]. VNP funkcija priklauso nuo jų lokalizacijos gene, t.y. ar jie yra geno promotoriuje, 3' ar 5' netransliuojamame regione (angl. *untranslated region*, UTR), egzone ar introne [168]. Genų promotoriai yra pagrindinės genų dalys, atsakingos už transkripciją ir veikia kaip *cis* elementai, galintys reguliuoti genų raišką. Žinoma, kad didelis VNP kiekis, aptinkamas genų promotoriuose, gali daugiau kaip 50 % modifikuoti genų raišką [169]. Ne mažiau reikšmingi ir kitose geno dalyse aptinkami VNP. Žinoma, kad VNP lemia įvairius biologinius mechanizmus ir net padidėjusią riziką sirgti tam tikromis ligomis [170].

Šiuo metu yra žinoma daugiau kaip 470 *VDR* geno VNP [171], kiti šaltiniai suskaičiuoja net iki 900 žmogaus *VDR* gene esančių alelių variantų, iš kurių geriausiai ištirti *FokI* (rs2228570), *BsmI* (rs1544410), *ApaI* (rs7975232) ir *TaqI* (rs731236) [172]. *BsmI* ir *ApaI* polimorfizmai lokalizuoti *VDR* geno 3'

galo introne tarp 8 ir 9 egzono, o *TaqI* yra aptinkamas 9 egzone. Visi šie trys polimorfizmai, esantys 3' *VDR* geno gale, manoma, yra paveldimi kartu ir sukelia tylias kodono mutacijas, susijusias su padidėjusiu *VDR* iRNR stabilumu, nors ir neturi įtakos *VDR* baltymo struktūrai [173]. Nors *ApaI*, *BsmI* ir *TaqI* polimorfizmų funkcija nėra iki galo aiški, tačiau manoma, kad šių polimorfiškų regionų paveldėjimas su kitais etiopatogenezeje svarbiais genais gali nulemti ligos išsivystymą. O *FokI* polimorfizmas, lokalizuotas pradžios kodone, t.y. 2-ame *VDR* geno egzone, lemia skirtingo ilgio *VDR* baltymo sintezę. Trumpajai 424 amino rūgščių baltymo izoformai būdingas didesnis aktyvumas, ji yra stabilesnė nei įprasta 427 amino rūgščių forma [164]. *VDR* geno polimorfizmai pavaizduoti 6 pav.



6 pav. *VDR* geno polimorfizmai. *VDR* – vitamino D receptorių. Adaptuota iš [174].

Manoma, kad vitamino D trūkumas ir genetiniai *VDR* variantai gali turėti įtakos autoimuninių, uždegiminių ligų, tokių kaip pirmo tipo cukrinis diabetas, išsėtinė sklerozė ir kt., vystymuisi ir progresavimui [175, 176]. Pastaraisiais dešimtmečiais *VDR* geno polimorfizmai tapo ir RA tyrimo objektu vertinant genetinių rizikos veiksnių įtaką ligai skirtingose pasaulio populiacijose. Visgi rezultatai skiriasi dėl tyrimų imties dydžio, statistinės galios, etninių grupių, ir galimos aplinkos ir genetinių veiksnių sąveikos. Todėl, turbūt tiksliausiai *VDR* VNP ir RA ligos ryšį galima įvertinti metaanalizių duomenimis.

2020 m. publikuotoje 17 tyrimų apimančioje metaanalizėje nustatytas *BsmI* *bb* genotipo ($\text{SS}=1,36$, 95% PI 1,06–1,76) ir RA rizikos ryšys [178]. Kitoje, 23 tyrimus analizavusioje apžvalgoje pateikta, kad *FokI* polimorfizmui būdingas apsauginis poveikis nuo RA išsivystymo tiek europiečiams, tiek Azijos gyventojams; *TaqI* mažina riziką sirgti RA arabams ir afrikiečiams, o padidėjusią riziką lemia tik *BsmI* variantas ir tik Afrikos populiacijos tiriamiesiems [179]. Priešingai nei pateiktoje analizėje, kitų autorių

publikacija, apėmusi 1703 RA atvejus ir 2635 kontrolinės grupės tiriamųjų rezultatus, nustatė *TaqI T* ir *FokI F* alelių ir RA ryšį. Tyrimo metu atlikta pogrupių analizė įrodė, kad etninė grupė, geografinis regionas, amžius ir vitamino D kiekis statistiškai reikšmingai lėmė VDR polimorfizmą ir RA ryšį [180]. Tą patį patvirtino ir Lee su bendraautorais paskelbti duomenys, įrodantys *FokI F* alelio nulėmtą RA riziką europiečiams [181]. Nors didžioji dalis tyrimų yra atlikta tiriant ryšį tarp VDR polimorfizmą ir padidėjusios rizikos sirgti RA, tačiau kiti autoriai nagrinėję ligos aktyvumo ir genetinių variantų sąsajas, nustatė *BsmI bb* genotipo ir mažesnio ligos aktyvumo ryšį [182]. Vertinant VDR polimorfizmą ryšį su RA susijusia osteoporozė, rasta asociacija su *FokI Ff* genotipu [183], o *TaqI t* ir *BsmI B* aleliai buvo susiję su greitesniu kaulo netekimu [184]. Galima daryti prielaidą, kad tam tikrų genetinių polimorfizmų kombinacija gali nulėmti padidėjusią riziką sirgti kai kuriomis ligomis, taip pat RA. Be to, kad aplinkos veiksniai ir etniškumas gali veikti VDR geno funkciją ir raišką [179, 185].

2.2.4. Vitamino D atsako kelio epigenetinis valdymas

Kaip aptarta anksčiau, epigenetiniai mechanizmai yra svarbūs genų raiškos reguliacijoje, o vitamino D ir epigenomo ryšys yra vertinamas keletu aspektų.

Pirmasis sąveikos su epigenomu lygis yra susijęs su vitamino D apykaitoje dalyvaujančių baltymų raiška. Genų, koduojančių VDR ir vitamino D metabolizuojančius fermentus CYP2R1, CYP27B1 ir CYP24A1, reguliacinės sekos turi gausias CpG salas, todėl šių sričių metilinimas gali lemti minėtų genų raiškos slopinimą ir sutrikusią vitamino D apykaitą [14, 186, 187]. Antrasis vitamino D endokrinologijos ir epigenomo ryšys apima tiesioginę VDR baltymo su chromatino komponentais arba koaktyvatoriais, pavyzdžiui, histonų acetiltransferazėmis, sąveiką. Pastarųjų aktyvumas lemia lokalų chromatino atlaisvinimą, kur gali jungtis VDR ligandas $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [187, 188]. VDR, jungdamasis su genomo DNR, taip pat gali formuoti kompleksus su korepresorių baltymais, susijusiais su histonų deacilazių aktyvumu, kurios atitinkamuose genomo lokusuose lemia uždara chromatiną. Tokiu būdu, prieš prisijungiant vitaminui D, korepresoriai paleidžiami ir pakeičiami koaktyvatorių kompleksais, taip reguliuojant genų raiškos aktyvumą [14, 189]. Yra žinoma, kad vitaminas D gali epigenetiškai veikti chromatiną modifikuojančius ir remodeluojančius baltymus, kuriuos koduojantys genai yra pirminiai VDR taikiniai. Taip vitaminas D daro įtaką histonų metilinimo lygiui sergant tam tikromis onkoproliferacinėmis ligomis [190, 191]. Galiausiai, yra duomenų, kad sergant prostatos karcinoma, VDR ligandai gali stimuliuoti ir tikslinių VDR genų reguliacinių sekų DNR demetilinimą [192]

taip pat slopinti arba skatinti raišką tam tikrų miRNR, kurios grįžtamojo ryšio principu taip pat geba reguliuoti 25(OH)D sintezę, katabolizmą ar signalo kelią [193]. Epigenetinės modifikacijos yra esminiai veiksniai, lemiantys VDR reguliuojamų genų raišką, taigi šių mechanizmų reguliavimo sutrikimas gali sukelti patologinius procesus [193]. Žinoma, kad vitamino D apykaitos genų DNR metilinimas ir histonų modifikacijos gali pakeisti chromatinio konformaciją iš atviros į uždara ir nulemti genų raiškos slopinimą. Vitamino D apykaitos genų raiška sutrinka sergant onkologinėmis, autoimuninėmis, infekcinėmis ligomis [194–197]. Manoma, kad šie pokyčiai yra iš dalies susiję su epigenetinėmis modifikacijomis ir yra intensyviai tiriama esant skirtingoms patologijoms.

Turbūt aktualiausias vitamino D atsako kelio genų epigenetinis valdymas yra susijęs su silpnesniu 1,25(OH)₂D₃ atsaku, kuris gali būti paveiktas vitamino D metabolizavimo genų promotorių metilinimo. Pagrindiniai vitamino D kiekio ir signalinio kelio reguliatoriai yra *CYP2R1*, *CYP24A1*, *CYP27B1* ir *VDR* genai, dar vadinami „vitamino D įrankių rinkiniu“ (angl. „the vitamin D tool“) [14]. *VDR* genas, lokalizuotas 12 chromosomoje, turi 4 potencialius promotorių regionus, kurių epigenetinis slopinimas lemia sumažėjusį jautrumą aktyviai vitamino D formai 1,25(OH)₂D₃ sergant įvairiomis ligomis [14, 198]. *CYP2R1*, esantis 11 chromosomoje (11p15.2 sritis) ir koduojantis mitochondrinį P450 fermentą 25-hidroksilazę, taip pat turi CpG salą geno promotoriaus srityje ir gali būti epigenetiškai reguliuojamas [199]. Kitas vitamino D metabolizme dalyvaujantis mitochondrinis fermentas 1 α -hidroksilazė, koduojamas 12 chromosomoje (12q13.1-q13.3) esančio *CYP27B1* geno, atsakingas už 25(OH)D₃ konversiją į aktyvią vitamino D formą kalcitriolį [199]. Nustatyta, kad, skirtingai nei prieš tai išvardytų genų, pastarojo CpG salos yra lokalizuotos geno kūne [200]. Manoma, kad ligos atveju *CYP27B1* DNR metilinimas gali sąlygoti sumažėjusią vietinę 1,25(OH)₂D₃ aktyvaciją vitamino D taikinių ląstelėse bei inkstuose ir taip riboti vitamino D funkciją [14]. *CYP24A1* genas, lokalizuotas 20 chromosomoje (20q13.2-q13.3), koduoja vitamino D katabolizuojantį baltymą 24-hidroksilazę ir turi vieną CpG salą, reguliuojamą DNR metilinimo būdu. Šioje geno srityje taip pat aptinkami keli atsako elementai, įskaitant du VDRE, vitaminus stimuliuojantį elementą ir SP1 jungimosi sritį [14, 199]. Yra žinoma, kad sveikose kepenų, skeleto raumenų, kraujo, smegenų ląstelėse ir odos fibroblastuose *CYP24A1* promotorius nėra metilintas, nors geno raiška labai varijuoja [201, 202]. O subrendusiose placentos ląstelėse *CYP24A1* metilinimo lygis yra aukštas, siekia 56,5% [202].

Žinoma, kad *VDR* ir *CYP* šeimos genų epigenetinė reguliacija gali lemti ir atsaką į vitamino D papildų vartojimą bei patį vitamino D kiekį organizme. Nedidelės imties viso genomo analizės studijos metu aptiktas aukštesnis *CYP2R1* geno metilinimo intensyvumas leukocituose asmenų, kuriems nustatytas išreikštas vitamino D trūkumas, palyginti su kontroline grupe [203]. Kitu tyrimu, vertinusių 12 mėnesių vitamino D papildus vartojusių pomenopauzinio amžiaus moterų kraujo ląstelių DNR, nustatyta, kad gydymo atsako neturėjusioms tiramosioms buvo būdingas didesnis *CYP2R1* metilinimo lygis tiek gydymo pradžioje, tiek pabaigoje. O abiejuose matavimo taškuose stebėtas žemesnis *CYP24A1* metilinimo lygis, taip pat jis neigiamai koreliavo su vitamino D kiekiu. Autoriai teigia, kad bazinis minėtų genų metilinimo lygis gali būti vertinamas kaip prognostinis vitamino D papildų atsako rodiklis [204]. Beckett ir kolegų tyrimas analizavęs *VDR*, *CYP2R1*, *CYP27B1* ir *CYP24A1* metilinimo lygį, taip pat nustatė silpną neigiamą koreliaciją tarp vitamino D kiekio ir *CYP2R1*, *CYP24A1* metilinimo lygio. *VDR* metilinimas tiesiogiai koreliavo su vitamino D kiekiu, o *CYP27B1* neparodė jokių reikšmingų asociacijų su vitaminu D [200]. Į analizę įtraukus vitamino D papildų, kalcio vartojimą, KMI, rūkymą, amžių, lytį ir kt. kintamuosius, nustatyta, kad *CYP2R1* metilinimas išliko nepriklausomas neigiamas vitamino D kiekio prognostinis rodiklis, o *VDR* geno – teigiamas [200]. 2020 m. publikuoto atsitiktinių imčių klinikinio tyrimo išvadose taip pat rašoma, kad *CYP* šeimos genų ir *VDR* geno metilinimo lygis yra susijęs su atsaku į gydymą vitaminu D [205].

Taigi remiantis pateiktais duomenis, stebimas stiprus vitamino D ir epigenetinių mechanizmų ryšys. Matome, kad pati vitamino D reguliacijos sistema geba lemti epigenetinius pokyčius esant tam tikroms patologinėms ir fiziologinėms būklėms, o kritiškai svarbių vitamino D atsako genų raiška gali būti slopinama DNR metilinimo būdu.

Glaustai apibendrinant, reikia paminėti, kad RA yra polietiologinė, sudėtingos imunopatogenezės liga, kurios išsivystymas ir eiga siejami su aplinkos, genetinių ir epigenetinių veiksnių sąveika. Vitaminas D, veikdamas per specifinius *VDR*, esančius daugelyje organizmo ląstelių yra svarbus imuninės sistemos funkcijai, pasižymi sisteminiu prieuždegiminiu ir imunomoduliuojančiu poveikiu. Vitamino D trūkumas yra plačiai paplitęs nutolusiose nuo pusiaujo geografinėse platumose gyvenančių žmonių populiacijose. RA sergantiems pacientams šis trūkumas gali būti sietinas su didesniu ligos aktyvumu, blogesne gyvenimo kokybe ir prastesniais fizinės sveikatos rodikliais. Manoma, kad vitamino D atsako efektyvumą gali lemti

ne tik endogeninio vitamino D kiekis, gamyba veikiant saulės šviesai, bet ir *VDR* geno polimorfizmai. Genetiškai predisponuoto asmens nuolatinis imuninis atsakas į nenustatytą antigeną sąlygoja autoimunogeniško susidarymą. Nors apie 40 % genetinių RA rizikos veiksnių apima *HLA-DRB1* lokuso aleliai, tačiau ne mažiau svarbūs ligos etiologijoje gali būti ir kiti kartu paveldinimi genetiniai regionai. Todėl daug dėmesio taip pat yra kreipiama į *VDR* geno *BsmI*, *FokI*, *Apal* ir *TaqI* polimorfizmus, kurių tam tikri aleliai ir genotipai, literatūros duomenimis, yra siejami su padidėjusia skirtingų geografinių regionų populiacijų rizika sirgti RA. Be genominio vitamino D poveikio, šis sekosteroidas pasižymi epigenetiniu aktyvumu. Epigenetinės modifikacijos – DNR metilinimas – yra būdingas tiek RA pažeistame sąnaryje, tiek yra nustatomas vitamino D atsako kelio (*CYP2R1*, *CYP24A1*, *CYP27B1* ir *VDR*) genų sekose. Šios modifikacijos gali lemti genų raiškos slopinimą, sutrikusią vitamino D apykaitą ir veikti vitamino D kiekį organizme. Be plačiai apžvalgoje aptarto vitamino D sisteminio, genetinio ir epigenetinio poveikio organizmui, svarbi ir lėtinės infekcijos – periodontito įtaka sergant RA. Bendri ligų etiopatogenezės mechanizmai neabejotinai sieja šias ligas, o didesnis sergamumas PD ir jo sunkumas sergantiesiems RA gali būti svarbus ir ligos išsivystymo procesuose, taip pat nepamirštant vitamino D trūkumo sąsajų.

3. TYRIMO METODIKA

Atliekant mokslinį tyrimą taikyti atvejo kontrolės (vitamino D koncentracijos kraujo serume, genetinių ir epigenetinių veiksnių vertinimui) ir vienmomentis skerspjūvio (lėtinio periodontito įvertinimui) metodai. Mokslinis darbas buvo atliekamas Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų (VULSK) Reumatologijos centre, bendradarbiaujant su VU Gyvybės mokslų centru atlikti *VDR* vieno nukleotido polimorfizmų ir DNR metilinimo tyrimai, o VULSK Laboratorinės medicinos centre – vitamino D (25(OH)D) koncentracijos kraujo serume nustatymas. VUL Žalgirio klinikoje gydytojas periodontologas atliko tiriamųjų burnos sveikatos ištyrimą, lėtinio periodontito įvertinimą. Taip pat, bendradarbiaujant su VULSK Šeimos medicinos centro šeimos gydytojais, įtraukti kontrolinės grupės tiriamieji. Kadangi tyrimas buvo tarpkryptinis, įgyvendinant uždavinius dalyvavo gydytojai reumatologai, šeimos gydytojai, mokslininkai, atliekantys genetinius tyrimus, gydytojai periodontologai ir laboratorinės medicinos specialistai.

Disertacijos autorė parengė ir pateikė dokumentus Vilniaus regioniniam biomedicininų tyrimų etikos komitetui atlikti tyrimą, gavusi leidimą atlikti tiriamųjų (RA sergančių pacientų ir kontrolinės grupės asmenų) atranką ir įtraukimą į tyrimą, anketavimą, reumatologinės būklės įvertinimą, taip pat kraujo mėginių ruošimą biocheminiams, genetiniams tyrimams, pildė duomenų bazę, atliko duomenų statistinį skaičiavimą, analizavo ir interpretavo gautus rezultatus, juos pristatė mokslinėse konferencijose, pirmo autoriaus teisėmis kartu su bendraautoriais parengė publikacijas.

3.1. Tiriamųjų įtraukimo ir neįtraukimo į tyrimą kriterijai

RA sergančiųjų ir kontrolinės grupės tiriamųjų atrinkimas, įtraukimas, grupių sudarymas ir ištyrimas buvo atliekamas VULSK Reumatologijos centre. Kontrolinės grupės tiriamieji į tyrimą buvo kviečiami VULSK Šeimos centro gydytojo, ir jei atitiko įtraukimo kriterijus nukreipti į Reumatologijos centrą. Visi įtraukti tiriamieji buvo supažindinti su tyrimo tikslais, tyrimų metodais, galima nauda ir žala (pateikta asmens informavimo forma) ir, pasirašę informuoto asmens sutikimo formą, įtraukti į tyrimą. Doktorantūros tyrimui atlikti buvo gauti Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimai (2016-11-08 Nr.158200-16-864-379 ir 2018-05-08 Nr.158200-18/5-1037-533). Iš Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos taip pat gautas leidimas tyrimo metu atlikti asmens duomenų tvarkymo veiksmus (2018-03-09 sprendimas Nr. 2R-1740(2.6-1.)).

Į mokslinį tyrimą iš viso įtraukti 206 RA sergantys pacientai (184 moterys ir 22 vyrai) ir 180 pagal amžių ir lytį į kontrolinę grupę atrinktų sveikų asmenų (163 moterys ir 17 vyrų). Autoimuniniu artritu sergantiems tiriamiesiems RA diagnozė buvo patvirtinta remiantis Amerikos reumatologų kolegijos (angl. *American College of Rheumatology*, ACR) ir EULAR 2010 m. reumatoidinio artrito klasifikacijos kriterijais arba 1987 m. ACR reumatoidinio artrito klasifikacijos kriterijais, jei diagnozė buvo patvirtinta iki 2010 m. [206, 207]. Tyrimo metu pateikus anketas surinkti visų RA tiriamosios grupės pacientų demografiniai, antropometriniai ir klinikiniai/medicininiai duomenys. RA grupės tiriamieji užpildė pateiktus klausimynus: Sveikatos vertinimo klausimyną (angl. *Health Assessment Questionnaire*, SVK) ir RA ligos poveikio klausimyną (angl. *Rheumatoid Arthritis Impact of Disease*, RAID) [208, 209]. RA ligos aktyvumo įvertinimui apskaičiuotas ligos aktyvumo indeksas DAS28, vertinantis 28 sutinusius ir skausmingus sąnarius, skausmo vizualinę analogijos skalę (VAS 100 mm) ir C reaktyvaus baltymo koncentraciją (mg/l). Pagal DAS28 CRB indekso reikšmę RA ligos aktyvumas vertintas atitinkamai: didelis ligos aktyvumas (>5,1), vidutinis

ligos aktyvumas (>3,2–5,1), nedidelis ligos aktyvumas (2,6–3,2) ir remisija (<2,6) [210]. Kontrolinės grupės tiriamiesiems (nesergantiems autoimuninėmis reumatinėmis ir nereumatinėmis ligomis, onkologinėmis, lėtinėmis dekompenсуotomis ligomis) pasirašius informuoto asmens sutikimo formą surinkti demografiniai, antropometriniai duomenys.

Tiriamosios grupės įtraukimo į tyrimą kriterijai:

1. Asmenys, vyresni nei 18 metų.
2. RA diagnozė patvirtinta remiantis ACR/EULAR 2010 m. diagnostikos kriterijais (arba 1987 m. ACR RA diagnostikos kriterijais, jei diagnozė nustatyta iki 2010 m.).
3. Ligos eigą modifikuojančių vaistų vartojimas bent 1 mėn.
4. Asmenys, sutinkantys dalyvauti tyrime ir pasirašę informuoto asmens sutikimo formą.

Tiriamosios ir kontrolinės grupių neįtraukimo į tyrimą kriterijai:

1. Asmenys, jaunesni nei 18 metų.
2. Nėštumas.
3. Sergantys kitomis autoimuninėmis ligomis (nervų, endokrininės sistemos, kt.).
4. Tiriamieji, kuriems per pastaruosius penkerius metus buvo diagnozuota piktybinė liga (išskyrus bazoceliulinę karcinomą, *Ca in situ*).
5. Sergantieji lėtinėmis dekompenсуotomis ligomis (pvz., kepenų cirozė, kt.).

Ar pacientai neturi neįtraukimo į tyrimą kriterijų buvo įvertinta remiantis tiriamojo medicinine dokumentacija, surinkta ligos ir gyvenimo anamneze.

Visiems RA ir kontrolinės grupės tiriamiesiems paimti kraujo mėginiai vitamino D koncentracijos, *VDR* geno polimorfizmą ir *VDR*, *CYP24A1*, *CYP2R1* DNR metilino tyrimams atlikti. Siekiant užtikrinti asmens duomenų apsaugą ir sumažinti subjektyvių veiksnių įtaką, visi tyrimo duomenys buvo koduojami.

Devyniasdešimt trims RA sergantiems tiriamiesiems (84 moterims ir 9 vyrams) VUL Žalgirio klinikoje užpildyta lėtinio periodontito rizikos veiksnių anketa, atliktas periodontologinis klinikinis ištyrimas. Ištyrimo metodika pateikiama toliau (žr. 3.5 punktą). Kita dalis tiriamųjų, atsisakiusių dalyvauti

šiam tyrimo etape, nesutiko dėl asmeninių ar socialinių priežasčių (vizitas darbo metu, nėra galimybės atvykti iš kito Lietuvos regiono ir t.t.).

Tiriamųjų imties tūrio skaičiavimas

Siekiant išlaikyti ne mažesnę nei 80 % kriterijaus galią ir 5 % reikšmingumo lygmenį, apskaičiuotas minimalus reikiamos imties dydis:

- VDR VNP analizė – 185 RA atvejai ir 185 kontrolinės grupės tiriamieji.
- DNR metilinimo tyrimas – darant prielaidą, kad metilinimo dažnis ligos atvejais ir kontrolinėje grupėje bus didelis, reikiamas imties dydis turėtų būti atitinkamai 180 ir 160. Metilinimo lygiui esant žemam, bet kelis kartus skiriantis tarp grupių, imties dydis atitinkamai turėtų siekti 130 ir 120. Statistiniam reikšmingumui išlaikyti esant vidutiniam metilinimo lygiui ir/ar nedideliame metilinimo skirtumui tarp grupių, tyrimas turi būti atliktas surinkus maždaug po 300 tiriamųjų grupes.
- Periodontito įvertinimo tyrimas –vienmomenčiam skerspjūvio tyrimui apskaičiuota reikiama imtis sudarė 90 tiriamųjų.

Imties dydžiui skaičiuoti naudotos G*Power ir OSSE programos. Iš viso į tyrimą buvo įtraukti 386 asmenys (206 sergantys RA ir 180 kontrolinės grupės asmenų), iš kurių periodontologinio tyrimo etape dalyvavo 93 tiriamieji, sergantys RA, taigi galima daryti išvadą, kad tiriamoji imtis buvo reprezentatyvi.

3.2. Vitamino D koncentracijos nustatymas

Visi tiriamieji (sergantieji RA ir kontrolinė grupė) į tyrimą buvo įtraukti 2017–2020 m. spalio–gegužės mėnesiais, atsižvelgiant į žinomus sezoninius 25(OH)D serumo lygio svyravimus ir galimą jų įtaką RA ligos aktyvumui ir kitiems klinikiniais rodikliais. Kraujo mėginiai buvo paimti naudojant *BD Vacutainer Serum Separator Tubes* (5 ml) (*BD Biosciences*, JAV) ir paruošti pagal standartines procedūras. Vitamino D serumo koncentracijos įvertinimas buvo atliktas VULSK Laboratorinės medicinos centre naudojant chemiliuminescencinę imuninę analizę (*Architect ci8200* analizatorius, *Abbott Laboratories*, JAV), kurios geba aptikti 25(OH)D₃ yra nuo 98,6 % iki 101,1 %, o 25(OH)D₂ – nuo 80,5 % iki 84,4 %. Vitamino D koncentracija buvo klasifikuojama remiantis 2011 m. paskelbtomis Tarptautinės endokrinologų draugijos gairėmis [116]. Vitamino D trūkumas konstatuotas, kai 25(OH)D koncentracija kraujo serume buvo <50 nmol/l, vitamino D

nepakankamumas – esant >50–75 nmol/l koncentracijai, o normaliu laikytas ≥ 75 nmol/l kiekis[116].

3.3. VDR genotipavimo tyrimai

Siekiant nustatyti VDR geno polimorfizmą (*BsmI*, *FokI*, *ApaI* ir *TaqI*) alelių ir genotipų dažnio pasiskirstymą tarp sergančių RA ir kontrolinės grupės asmenų, atlikti genotipavimo tyrimai. Šiame tyrimo etape ištirti visų į tyrimą įtrauktų tiriamųjų (206 RA sergantys pacientai ir 180 kontrolinės grupės asmenų) kraujo mėginiai.

3.3.1. Ląstelių paruošimas ir DNR gryninimas

Kraujo mėginiai VDR geno polimorfizmą tyrimams paimti naudojant *BD Vacutainer® CPT™ Mononuclear Cell Preparation Tube – Sodium Citrate* mėgintuvėlius (*BD Biosciences*, JAV). Periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės (leukocitai) paruoštos laikantis gamintojo rekomendacijų ir standartizuotų procedūrų reikalavimų: mėgintuvėliai su kraujo mėginiais centrifuguojami (*Centrifuge, Heraeus Megafuge 8 Centrifuge, Thermo Scientific (TS)* dalis *Thermo Fisher Scientific (TFS)*, JAV), susidaręs plazmos sluoksnis nusiurbiamas, o atsiskybę leukocitai perkeliama į atskirą mėgintuvėlį, kur toliau atliekamas etapinis centrifugavimas ir ląstelių plovimas naudojant PBS (angl. *phosphate-buffered saline*, *Biochrom*, Vokietija) buferį. Vėliau kriomėgintuvėliai su paruoštomis ląstelėmis laikomi -70 °C temperatūroje iki kitų tyrimo etapų.

Surinkus pakankamą mėginių imtį, atlikta tolesnė genetinė analizė – DNR gryninimas. DNR buvo išskirta naudojant komercinį *GeneJET Genomic DNA Purification Kit (TFS)* ir laikantis gamintojo rekomendacijų. Išskirtos DNR koncentracija išmatuota naudojant *NanoDrop® 2000* spektrofotometrą (*TS, TFS*), grynumas įvertintas taikant 260/280 ir 260/230 santykį. Kiekvieno tiriamojo DNR lygiomis dalimis padalyta į du *LoBind (Eppendorf, Vokietija)* 1,5 ml mėgintuvėlius, kurių vienas naudotas genotipavimo, kitas DNR metilinimo tyrimams. Visi mėgintuvėliai koduoti ir laikyti -80 °C temperatūroje.

3.3.2. Kiekybinė polimerazės grandininė reakcija (kPGR)

Keturių *VDR* geno vieno nukleotido polimorfizmų *BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *FokI* (rs2228570) ir *ApaI* (rs7975232) analizė atlikta naudojant jautrius ir specifiskus *TaqMan* zondus ir taikant kiekybinę polimerazės grandininę reakciją (kPGR). Laikantis gamintojo rekomendacijų išskirta DNR pagausinta naudojant genotipavimui skirtus pradmenų ir zondų rinkinius *TaqMan SNP Genotyping Assay (AB, TFS, JAV)*, $2 \times$ PGR mišinį *TaqMan Universal Master Mix II with UNG* (Uracil-N-glikozilazė) (*AB, TFS*) ir vandenį be RNazių. kPGR reakcijos atliktos naudojant realaus laiko PGR instrumentą *QuantStudio 5 Real-Time PCR System (AB, TFS)*. PGR reakcijos temperatūrinio režimo sąlygos buvo pritaikytos *TaqMan* PGR mišiniui (2 lentelė). Kiekvienos reakcijos metu buvo naudojama taršos kontrolė ir trys teigiamos kontrolės – mėginiai, atspindintys tris genotipų klases: homozigotinį genotipą pagal dažnai paplitusį alelio variantą, homozigotinį genotipą pagal retąjį alelį ir heterozigotinį mėginį. Genotipavimo duomenys analizuoti naudojant *QuantStudio 5 Real-Time PCR System program* (versija 1.3, *AB, TFS, JAV*).

2 lentelė. kPGR reakcijos temperatūrinis režimas

Temperatūra, °C	Trukmė	Ciklai	Etapas
95	10 min	1	Fermento aktyvinimas
95	15 s	40	DNR grandinių atskyrimas
60	1 min		Pradmenų, zondų prilydimas, grandinės ilginimas, zondų skėlimas
4	∞	1	Reakcijos stabdymas/saugojimas

DNR – deoksiribonukleorūgštis; kPGR – kiekybinė polimerazės grandininė reakcija

3.4. *VDR, CYP2R1, CYP24A1* DNR metilinimo tyrimai

Vitamino D signalo kelio genai *VDR, CYP2R1* ir *CYP24A1* turi dideles CpG salas savo reguliacinėse sekose, todėl gali būti metilinti ir epigenetiškai reguliuojama jų raiška. Remiantis šiais duomenimis minėti genai buvo atrinkti DNR metilinimo analizei. Iš viso ištirti 76 tiriamųjų (35 sergančių RA ir 41 pagal amžių ir vitamino D koncentraciją atrinkto kontrolinės grupės asmens) DNR mėginiai.

3.4.1. DNR bisulfitinė modifikacija

Atrinktų tiriamųjų DNR mėginiams atlikta DNR bisulfitinė modifikacija *EZ DNA Methylation*TM rinkiniu pagal gamintojo protokolą (*Zymo Research, JAV*). Šios konversijos metu nemetilintas citozinas pakeičiamas į uracilą, o metilintas citozinas išlieka nepakitęs. Mėginiai su modifikuota DNR koduojami ir laikomi –20 °C temperatūroje. PGR ir pirosekoskaitos pradmenų kūrimui naudota *Ensembl* duomenų bazė (<https://www.ensembl.org/index.html>) ir programinė įranga *PyroMark Assay Design Software* (versija 2.0.1.15, *Qiagen*, 2008, Vokietija). PGR ir pirosekoskaitos pradmenų sekos pateiktos 3 lentelėje. Parinkus optimalius PGR reakcijos temperatūrinius režimus pradmenų prisijungimui prie modifikuotos DNR ir laikantis gamintojo protokolo, atliktas taikinių pagausinimas naudojant PGR reakcijos mišinį. Pagausintas produktas patikrintas vykstant elektroforezei 3 % agarozės gelyje.

3 lentelė. *VDR, CYP2R1, CYP24A1* genų PGR ir pirosekoskaitos pradmenys

	Pradmenų sekos	Ilgis, nt	GC, %	Amplikono ilgis, bp
<i>VDR-p¹</i>	GTTGGGTTGTTTTGTTTGT AAAAG	26	30,8	131
<i>VDR-ap²</i>	Biotinas- CCTATCCTAAAACCCCCTTT C	21	47,6	
<i>VDR-seq³</i>	TTGTTTTTGTTTGTTAAAAG G	21	23,8	–
<i>CYP2R1-p¹</i>	GGAAGTTTTGGAGAGTTGAA GAG	23	43,5	222
<i>CYP2R1-ap²</i>	Biotinas- CCTCTCCCTACACCTAACTC TACTTTCT	28	46,4	
<i>CYP2R1-seq³</i>	AGTTGTTGAAGTAGAGG	17	41,2	–

3 lentelės tęsinys

CYP24A1- p¹	AGTGTAAGGAGGTATTA TGTTTTGA	26	30,8	130
CYP24A1- ap²	Biotinas- AAAAAAACAAAAAAACC AACTAATATAAT	30	13,3	
CYP24A1- seq³	GGAGGTATTAATGTTTTGA G	20	35,0	–

PGR – polimerazės grandininė reakcija; p¹ – prasminis pradmuo; ap² – antiprasminis pradmuo; seq³ – pirosekoskaitos pradmuo; nt – nukleotidai; bp – bazių poros.

3.4.2. VDR, CYP2R1, CYP24A1 pirosekoskaita

Pirosekoskaitos metodas leidžia kiekybiškai įvertinti kiekvieno citozino metilinimo lygį konkrečioje tiriamoje sekoje. Rengiant šį disertacijos darbą atrinktų mėginių metilinimo intensyvumas (MI) įvertintas 10 VDR CpG pozicijų, 6 CYP2R1 CpG pozicijose ir 7 CYP24A1 CpG pozicijose. PGR produktų pirosekoskaita atlikta naudojant *PyroMark Gold Q24 Reagents* rinkinį ir kitus reagentus (*Qiagen*) laikantis gamintojo rekomendacijų. Kiekvieno geno CpG pozicijų metilinimo lygis vertintas naudojant *PyroMark Q24* programinę įrangą (versija 2.0.6, *Qiagen*, 2009) ir pateiktas procentine išraiška.

3.5. Periodontologinis tiriamųjų įvertinimas

Siekiant įvertinti lėtinio periodontito pasireiškimo dažnį sergantiems RA, 93 tiriamiesiems atliktas detalus odontologinis gydytojo periodontologo ištyrimas VUL Žalgirio klinikoje. Periodontologinį ištyrimą sudarė visų dantų zondavimas graduotu zonu 6 taškuose ir ortopantomograma. RA pacientų periodonto būklė vertinta remiantis šiais parametrais: kraujavimo indeksas (KI, %), zondavimo gylis (ZG, mm), periodonto jungties netekimo lygis (PNL, mm), alveolinio kaulo rezorbcija (AKR, %), netektų dantų skaičius. Periodontito diagnozė patvirtinta remiantis 2018 m. Amerikos periodontologų akademijos (angl. *American Academy of Periodontology*) ir Europos periodontologų federacijos (angl. *European Federation of Periodontology*) periodontito klasifikacijos gairėmis [211]. Remiantis gairėmis lėtinis periodontitas suskirstytas pagal stadijas, atitinkamai: I stadija – lengvas lėtinis PD; II stadija – vidutinio sunkumo lėtinis PD; III stadija – sunkus lėtinis PD;

IV stadija – pažengęs sunkus lėtinis PD. Tiriamieji, kurie neatitiko PD diagnostikos kriterijų, buvo laikomi periodontologiškai sveikais (RA+PD–), o visi likę, kuriems buvo diagnozuotas lengvas, vidutinis ar sunkus PD, priskirti periodontitu sergančiųjų (RA+PD+) grupei. Periodontologinėje anketoje surinkti duomenys apie tiriamųjų burnos higienos ir žalingus įpročius (rūkymą, alkoholio vartojimą, kt.). Tiriamieji, turintys mažiau nei 8 dantis ir vartojantys periodonto audinius galinčius paveikti medikamentus (pvz., kalcio kanalo blokatorius, kt.) nebuvo įtraukti į tiriamųjų imtį. Visi kiti įtraukimo ir neįtraukimo į tyrimą kriterijai išvardyti 3.1 punkte.

3.6. Statistinė duomenų analizė

Tiriamųjų demografiniams, klinikiniais, biocheminiams kintamiesiems palyginti taikytas aprašomosios statistikos metodas (vidurkis, mediana, standartinis nuokrypis, kt.). Duomenų normalumui tikrinti naudotas Šapiro ir Vilko testas (angl. *Shapiro-Wilk normality test*). Esant normaliai pasiskirsčiusiems duomenims, vidurkių analizei taikyti parametriniai kriterijai (*t-test*, ANOVA), nesant normalumo – neparametriniai kriterijai (*Wilcoxon*, *Kruskal–Wallis*, *Mann-Whitney U test*). Koreliacijoms tarp kintamųjų atitinkamai naudoti Pirsono arba Spirmeno koreliacijos koeficientai. VDR VNP alelių/genotipų dažnių pasiskirstymui apskaičiuoti naudotas chi kvadrato kriterijus (angl. *Chi-square test*). RA rizikos ir VDR geno alelių/genotipų ryšio įvertinimui atliktas šansų santykio (ŠS) ir 95 % pasikliautinąjo intervalo (PI) skaičiavimas.

VDR, CYP2R1 ir CYP24A1 DNR metilinimas įvertintas kokybiškai – t.y. pagal kontrolinių mėginių MI vidurkį buvo apskaičiuotas genų bazinis metilinimo lygis – mėginiai suskirstyti į metilintus ir nemetilintus. Tokiu būdu apskaičiuotas metilinimo dažnis (MD). Kategorinių kintamųjų ryšiui įvertinti naudotas chi kvadrato kriterijus arba Fišerio testas. Kiekybiniam VDR, CYP2R1 ir CYP24A1 MI (procentais) įvertinimui pritaikius Šapiro ir Vilko normalumo testą, atitinkamai naudoti *t* testo arba Mano ir Vitnio rango sumų kriterijus (angl. *Mann-Whitney rank-sum test*). Duomenys laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

Statistinei duomenų analizei ir duomenų vizualizavimui naudotos *Microsoft Office Excel 2016* (Microsoft Corporation, JAV), *R* (versija 1.1.383, RStudio Inc, JAV), *SPSS* statistinis paketas (V22.0, IBM, JAV), *GraphPad Prism* (versija 7.03, GraphPad Software, JAV), *MedCalc* (versija 14.8.1, MedCalc Software Ltd., Belgija), *Stata/MP 13.0* (StataCorp LP, JAV) programos, *ClustVis* internetinis įrankis [212].

4. REZULTATAI

4.1. Demografiniai ir klinikiniai tiriamųjų duomenys

Tiriamuoju laikotarpiu, nuo 2017 m. iki 2020 m. sausio su sezoniniais intervalais (kaip aprašyta 3.2. punkte), į tyrimą buvo įtraukti 386 asmenys. RA sergančių pacientų grupę sudarė 206 tiriamieji (184 moterys ir 22 vyrai), iš kurių 76 vartojo vitamino D papildus, 130 – jų nevartojo; 109 pacientai buvo gydomi biologiniais ligą modifikuojančiais vaistais (bLMV) kartu su tradiciniais sintetiniais LMV (metotreksatas, sulfasalazinas, hidroksichlorokvinas, kt.), likę 97 – tik tradiciniais sintetiniais LMV. Vidutinis RA pacientų amžius įtraukimo į tyrimą metu buvo $55,01 \pm 11,08$ metai, vidutinė RA ligos trukmė $11,71 \pm 9,22$ metai. Palyginamajai analizei 180 kontrolinės grupės tiriamųjų (163 moterys ir 17 vyrų) buvo įtraukti į tyrimą suderinus su sergančių RA tiriamųjų grupe pagal amžių ir lytį. Kontrolinės grupės amžiaus vidurkis įtraukimo į tyrimą metu buvo $53,15 \pm 10,68$ metai. Detali aprašomoji duomenų statistinė analizė pateikiama 4 lentelėje.

4 lentelė. Demografiniai, klinikiniai, biocheminiai sergančiųjų RA ir kontrolinės grupės duomenys

Kintamasis	Sergantieji RA (n=206)	Kontrolinė grupė (n=180)	p reikšmė
Lytis (moterys/vyrai)	184/22	163/17	0,6879
Amžius (metais)	$55,01 \pm 11,08$	$53,15 \pm 10,68$	0,0975
KMI (kg/m ²)	$25,62 \pm 4,64$	$26,46 \pm 4,74$	0,1005
25(OH)D (nmol/l): trūkumas (n, %) nepakankamumas (n, %) norma (n, %)	44,96 ± 21,92 127 (62,62) 57 (27,67) 20 (9,71)	54,90 ± 22,82 79 (43,89) 73 (40,55) 28 (15,56)	p<0,0001*
Rūkymas (n): taip ne	34 172	18 162	0,0619
Susirgimo RA amžius (metais)	$43,30 \pm 12,80$	–	–
Sirgimo RA trukmė (metais)	$11,71 \pm 9,22$	–	–

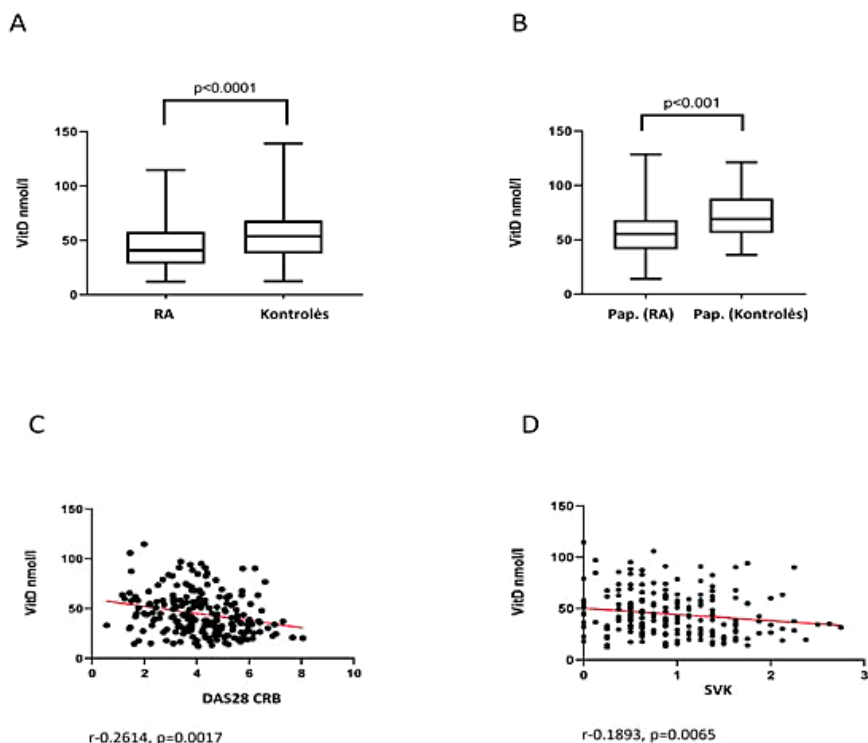
4 lentelės tęsinys

DAS28 CRB ligos aktyvumas:	4,16 ± 1,46	–	–
didelis (n, %)	56 (27,18)		
vidutinis (n, %)	98 (47,57)		
nedidelis (n, %)	19 (9,22)		
remisija (n, %)	33 (16,01)		
SVK	0,95 ± 0,61	–	–
RAID	4,74 ± 2,23	–	–
CRB (mg/l)	12,55 ± 21,7	–	–
VAS (mm)	45,57 ± 20,88	–	–

Reikšmės atspindi vidurkį ± standartinį nuokrypį arba n, %; CRB – C reaktyvus baltymas; DAS28 – ligos aktyvumo indeksas 28; KMI – kūno masės indeksas; RA – reumatoidinis artritas; RAID – reumatoidinio artrito ligos poveikio klausimynas; SVK – sveikatos vertinimo klausimynas; VAS – skausmo vizualinė analogijos skalė.
* – statistiškai reikšmingi skirtumai.

4.2. Vitamino D kiekio ir reumatoidinio artrito klinikinių duomenų sąsajos

Tyrimo metu 25(OH)D trūkumas (<50 nmol/l) nustatytas 62,62% sergančių RA tiriamųjų (n=127), nepakankamumas (>50–75 nmol/l) 27,67% (n=57), o normali (≥75 nmol/l) vitamino D koncentracija tik 9,71% (n=20) tiriamųjų. Vidutinė vitamino D koncentracija sergančių RA kraujo serume buvo statistiškai reikšmingai mažesnė už kontrolinės grupės tiriamųjų vitamino D koncentraciją (44,96 ± 21,92 vs. 54,90 ± 22,82 nmol/l, $p < 0,0001$) (7 pav., A). Vitamino D papildus vartojantiems sergantiems RA tiriamiesiems taip pat buvo nustatyta mažesnė vitamino D koncentracija palyginti su papildus vartojančiais sveikais asmenimis, $p < 0,001$ (7 pav., B). Mūsų duomenys taip pat patvirtino statistiškai reikšmingą neigiamą vitamino D kiekio koreliaciją su DAS28 CRB ligos aktyvumo indeksu ($r = -0,2614$, $p = 0,0017$) ir SVK balu ($r = -0,1893$, $p = 0,0065$) sergant RA (7 pav., C, D). Priešingai – reikšmingų koreliacijų vertinant 25(OH)D kiekio ir RAID ryšį nustatyta nebuvo. Visgi vartojantiems vitamino D papildus sergantiems RA pacientams buvo būdinga didesnė 25(OH)D koncentracija kraujyje ir mažesnis DAS28 CRB ligos aktyvumas ($p < 0,05$). Taigi galima daryti prielaidą, kad didesnė vitamino D koncentracija yra susijusi su mažesniu RA aktyvumu.



7 pav. Vitamino D (VitD) kiekis tiriamųjų kraujo serume ir koreliacija su klinikiniais reumatoidinio artrito (RA) rodikliais. **(A)** – VitD kiekio (nmol/l) palyginimas tarp sergančių RA ir kontrolinės grupės asmenų; **(B)** – VitD kiekis tarp vartojančių papildus (pap.) RA ir kontrolinės grupės asmenų; **(C)** – VitD koreliacija su RA ligos aktyvumo indeksu (DAS28 CRB); **(D)** – VitD koreliacija su sveikatos vertinimo klausimynu (SVK).

4.3. VDR geno polimorfizmų analizė

Rengiant šį disertacinį darbą pirmą kartą tirtoje Lietuvos populiacijos imtyje buvo įvertintas *FokI*, *ApaI*, *TaqI* ir *BsmI* VDR geno polimorfizmų dažnis sergantiems RA ir kontrolinės grupės asmenims. Genotipų dažnių įvertinimui pritaikytas Hardžio ir Veinbergo (angl. *Hardy–Weinberg*, H–V) dėsnis. *FokI*, *ApaI*, *TaqI* ir *BsmI* genotipų, išskyrus *BsmI* polimorfizmo RA grupėje ($p=0,045$), pasiskirstymas atitiko H–V pusiausvyrą. Mokslinio tyrimo metu statistškai reikšmingo ryšio tarp keturių tirtų VDR polimorfizmų alelių ar genotipų ir padidėjusios rizikos (ŠS, 95% PI) sirgti RA nerasta (5 lentelė). Įvertinus tirtų polimorfizmų alelių ar genotipų pasiskirstymą tarp RA ir kontrolinės grupės tiriamųjų, statistškai reikšmingų skirtumų taip pat nerasta ($p>0,05$).

5 lentelė. VDR geno polimorfizmų genotipų ir alelių dažniai sergančiųjų RA ir kontrolėje grupėje

	Genotipų dažnis, n (%)				Alelių dažnis, n (%)			ŠS (95 % PI)	H-V $X^2(p)$
	AA	Aa	aa	$X^2(p)$	A	a	$X^2(p)$		
<i>Apal</i>									
Sergantieji RA (206)	56 (27)	99 (48)	51 (25)	1,172 (0,557)	211 (51)	201 (49)	0,322 (0,570)	0,983 (0,618– 1,564)	0,302 (0,583)
Kontrolinė grupė (180)	41 (23)	95 (53)	44 (24)		177 (49)	183 (51)		1,085 (0,818– 1,440)	0,561 (0,454)
<i>TaqI</i>	<i>TT</i>	<i>Tt</i>	<i>tt</i>		<i>T</i>	<i>t</i>			
Sergantieji RA (206)	95 (46)	92 (45)	19 (9)	0,014 (0,993)	282 (68)	130 (32)	0,002 (0,961)	1,041 (0,519– 2,092)	0,237 (0,626)
Kontrolinė grupė (180)	83 (46)	81 (45)	16 (9)		247 (69)	113 (31)		1,008 (0,743– 1,366)	0,360 (0,548)
<i>BsmI</i>	<i>BB</i>	<i>Bb</i>	<i>bb</i>		<i>B</i>	<i>b</i>			
Sergantieji RA (206)	91 (44)	101 (49)	14 (7)	0,036 (0,982)	283 (69)	129 (31)	0,001 (0,981)	0,937 (0,428– 2,049)	4,028 (0,045)
Kontrolinė grupė (180)	80 (45)	87 (48)	13 (7)		247 (69)	113 (31)		0,996 (0,735– 1,351)	2,685 (0,101)
<i>FokI</i>	<i>FF</i>	<i>Ff</i>	<i>ff</i>		<i>F</i>	<i>f</i>			
Sergantieji RA (206)	43 (21)	110 (53)	53 (26)	0,085 (0,958)	196 (48)	216 (52)	0,045 (0,832)	1,071 (0,675– 1,699)	1,023 (0,312)
Kontrolinė grupė (180)	38 (21)	98 (55)	44 (24)		174 (48)	186 (52)		1,031 (0,777– 1,368)	1,461 (0,227)

H-V – Hardžio ir Veinbergo pusiausvyra; X^2 – chi kvadratų kriterijus; PI – pasikliautinis intervalas; p – p reikšmė; RA – reumatoidinis artritas; ŠS – šansų santykis; VDR – vitamino D receptoriai.

Vitamino D koncentracija statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp RA ir kontrolinės grupės tiriamųjų analizuojant pagal keturis VDR polimorfizmus, išskyrus *TaqI tt*, *BsmI bb* ir *FokI ff* genotipus ($p < 0,005$) (6 lentelė). Sergantieji RA ir kontrolinės grupės tiriamieji, turintys recesyvinius *TaqI*, *BsmI* ir *FokI*

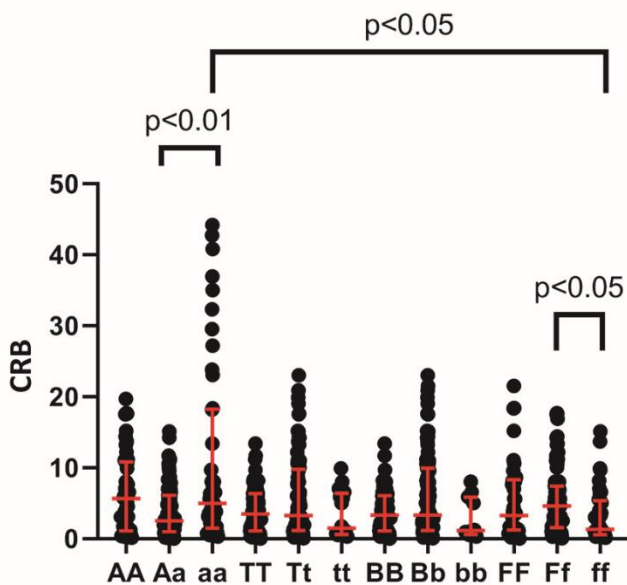
alelius, pasižymėjo panašiomis vitamino D koncentracijomis. Taip pat tendencingai didesnė vitamino D koncentracija aptikta *TaqI tt* genotipo tiriamųjų kraujo serume, palyginti su *TaqI Tt* genotipo tiriamųjų koncentracija ($p=0,0597$) bei *BsmI bb* palyginti su *Bb* genotipo tiriamųjų koncentracija ($p=0,1145$).

6 lentelė. Vidutinė vitamino D koncentracija sergančių RA ir kontrolinės grupės tiriamųjų kraujo serume pagal *VDR* genotipus

Genotipas	Sergantieji RA	Kontrolinė grupė	<i>p</i> reikšmė
Vitamino D koncentracija (nmol/l, $V \pm SN$)			
<i>Apal</i>			
<i>AA</i>	43,46 ± 23,52	54,89 ± 21,7	0,0034*
<i>Aa</i>	45,3 ± 22,37	53,71 ± 23,05	0,009*
<i>aa</i>	45,87 ± 19,44	57,49 ± 23,64	0,0087*
<i>TaqI</i>			
<i>TT</i>	46,2 ± 20,65	56,47 ± 24,3	0,0014*
<i>Tt</i>	42,86 ± 24,29	53,11 ± 21,33	0,0003*
<i>tt</i>	48,88 ± 14,8	55,86 ± 23,02	0,2869
<i>BsmI</i>			
<i>BB</i>	46,62 ± 20,71	56,78 ± 23,66	0,0012*
<i>Bb</i>	43,15 ± 23,97	53,62 ± 22,16	0,0002*
<i>bb</i>	47,16 ± 11,9	51,89 ± 22,83	0,8952
<i>FokI</i>			
<i>FF</i>	42,54 ± 18,62	54,99 ± 24,1	0,0123*
<i>Ff</i>	44,97 ± 23,75	56,12 ± 22,08	<0,0001*
<i>ff</i>	43,4 ± 20,59	46,0 ± 23,62	0,2143

RA – reumatoidinis artritas; *VDR* – vitamino D receptorius; $V \pm SN$ – vidurkis ± standartinis nuokrypis; * – statistiškai reikšmingi skirtumai.

Tyrimo rezultatai parodė, kad vidutinė CRB koncentracija (mg/l) buvo statistiškai reikšmingai didesnė sergančių RA tiriamųjų, kuriems nustatytas *Apal aa* vs. *Aa* genotipas ($p=0,0049$), *FokI Ff* vs. *ff* genotipas ($p=0,0162$) ir *aa* vs. *ff* genotipas ($p=0,0061$), serume. Remiantis šiais rezultatais galima daryti prielaidą, kad *Apal aa* genotipas yra susijęs su didesne CRB koncentracija sergant RA (8 pav.).



8 pav. C reaktyvus baltymo (CRB) koncentracija ir vitamino D receptoriaus (*VDR*) geno polimorfizmai sergančiųjų reumatoidiniu artritu (RA) grupėje.

4.4. *VDR*, *CYP2R1*, *CYP24A1* genų DNR metilinimo analizės rezultatai

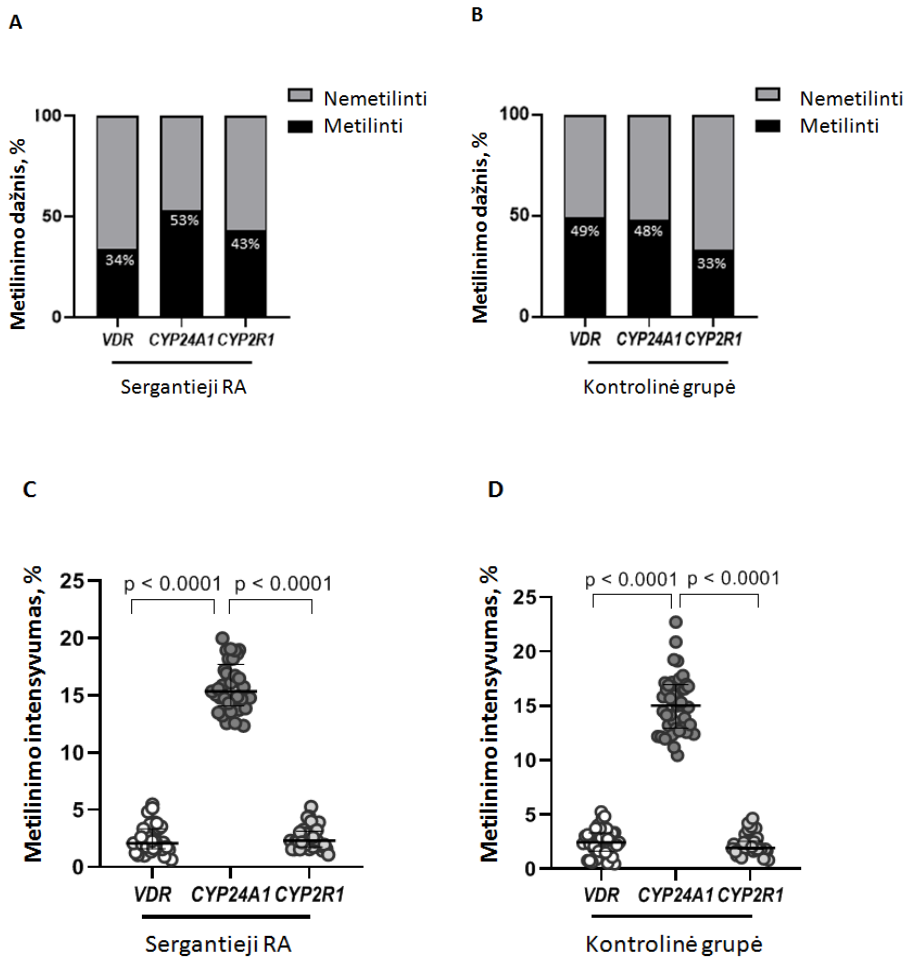
Remiantis mokslinės literatūros duomenimis, rengiant šį disertacijos darbą pirmą kartą buvo įvertintas vitamino D apykaitos genų (*VDR*, *CYP2R1*, *CYP24A1*) DNR metilinimo pokyčių profilis sergančių RA ir sveikų asmenų leukocituose. Tyrimo metu DNR metilinimo intensyvumas ir metilinimo dažnis buvo įvertinti 35 RA sergantiems pacientams ir 41 kontrolinės grupės tiriamajam. Vidutinis RA pacientų amžius įtraukimo į tyrimą metu buvo $51,63 \pm 10,45$ metai, vidutinė RA ligos trukmė $12,40 \pm 8,22$ metai. Palyginamajai analizei kontrolinę grupę, suderintą su tiriamąja grupe pagal amžių, lytį ir vitamino D kiekį, sudarė vidutiniškai $50,78 \pm 11,85$ metų asmenys. Siekiant kuo tiksliau įvertinti epigenetinius skirtumus tarp atvejo ir kontrolinės grupių, vitamino D koncentracija abiejose tiriamųjų grupėse statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($50,89 \pm 29,54$ vs. $56,05 \pm 28,67$, $p > 0,05$). Detali aprašomoji antropometrinių, sociodemografinių ir klinikinių duomenų analizė pateikta 7 lentelėje.

7 lentelė. DNR metilinimo analizės tiriamųjų duomenų charakteristikos

Kintamasis	Sergantieji RA, n=35	Kontrolinė grupė, n=41	<i>p</i> reikšmė
Lytis (n, %)			0,91
moterys	34 (97,1)	40 (97,5)	
vyrai	1 (2,9)	1 (2,5)	
Amžius (metais)	51,63 ± 10,45	50,78 ± 11,85	0,74
KMI (kg/m ²)	25,60 ± 4,39	26,22 ± 5,51	0,99
Rūkymas (n, %):			0,54
rūko	3 (8,6)	2 (4,9)	
anksčiau rūkė	4 (11,4)	8 (19,5)	
nerūko	28 (80)	31 (75,6)	
DAS28 CRB ligos aktyvumas:	4,20 ± 1,45		
didelis (n, %)	7 (20)	–	–
vidutinis (n, %)	20 (57,2)		
nedidelis (n, %)	4 (11,4)		
remisija (n, %)	4 (11,4)		
Ligos trukmė (metais)	12,40 ± 8,22	–	–
25(OH)D (nmol/l):	50,89 ± 29,54	56,05 ± 28,67	0,2745
trūkumas (n, %)	16 (45,7)	17 (41,5)	
nepakankamumas (n, %)	10 (28,6)	11 (26,8)	
norma (n, %)	9 (25,7)	13 (31,7)	
CRB (mg/l)	6,32 ± 7,12	–	–

Reikšmės atspindi vidurkį ± standartinį nuokrypį arba n, %; CRB – C reaktyvus baltymas; DAS28 – ligos aktyvumo indeksas 28; KMI – kūno masės indeksas.

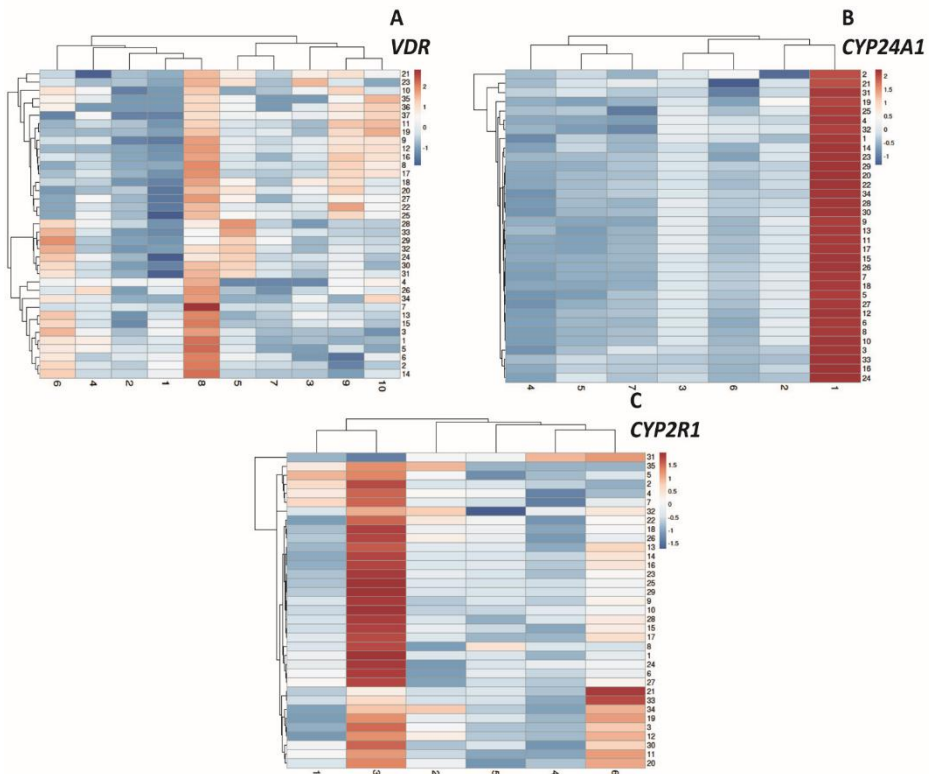
VDR, CYP2R1, CYP24A1 genų DNR metilinimo profilis. Tyrimo metu apskaičiuotas vidutinis *VDR, CYP2R1* ir *CYP24A1* metilinimo intensyvumas sergančių RA ir kontrolinės grupės tiriamųjų leukocituose buvo mažas: *VDR* geno 2,39 % vs. 2,48%, *CYP2R1* 2,53 % vs. 2,41%, o *CYP24A1* geno 16,02 % vs. 15,17 %. Pagal kontrolinių mėginių MI vidurkį apskaičiuotas genų metilinimo dažnis – mėginiai suskirstyti į metilintus ir nemetilintus (9 pav., A, B). Nors statistškai reikšmingų skirtumų tarp RA ir kontrolinės grupės tirtų genų MI nenustatyta ($p > 0,05$), tyrimo rezultatai parodė reikšmingai didesnę *CYP24A1* MI, palyginti su *VDR* ir *CYP2R1* genų metilinimo intensyvumu ($p < 0,0001$). Skirtumų nustatyta abiejose tiriamųjų grupėse (9 pav. C, D).



9 pav. VDR, CYP24A1 ir CYP2R1 metilavimo dažnis (%) reumatoidinio artrito (RA) (A) ir kontrolinėje grupėje (B); VDR, CYP24A1, CYP2R1 genų metilavimo intensyvumo (%) palyginimas RA (C) ir kontrolinėje grupėje (D).

VDR, CYP2R1, CYP24A1 atskirų CpG pozicijų metilavimo intensyvumo analizė. Rengiant šį disertacinį darbą, atrinktų mėginių MI įvertintas 10 VDR CpG pozicijų, 6 CYP2R1 CpG pozicijose ir 7 CYP24A1 CpG pozicijose. Rezultatų palyginimas tarp sergančių RA ir kontrolinės grupės tiriamųjų naudojant hierarchinės klasterizacijos metodą statistiškai reikšmingų skirtumų neparodė ($p > 0,05$). Tačiau, vertinant atskiras CpG pozicijas sergančių RA tiriamojame grupėje, nustatyta intensyviau metilinta VDR geno 8 CpG pozicija palyginti su 1–4 bei 7 CpG pozicijomis (1 vs. 8 $p < 0,0001$; 2 vs. 8 $p < 0,0001$; 3 vs. 8 $p = 0,0060$; 4 vs. 8 $p = 0,0014$; 7 vs. 8 $p = 0,0032$). Taip pat stipriau metilinta

CYP24A1 geno 1 CpG pozicija palyginti su 2–7 pozicijomis ($p < 0,0001$) bei rasti statistškai reikšmingi skirtumai tarp 3 ir 4–7 šio geno CpG pozicijų (3 vs. 4 $p < 0,0001$; 3 vs. 5 $p = 0,0005$; 3 vs. 6 $p = 0,0079$; 3 vs. 7 $p = 0,0020$). Įvertinus *CYP2R1* geno atskirų pozicijų metilinimą rasta statistškai reikšmingai stipriau metilinta 3 CpG pozicija palyginti su 1–5 pozicijomis (1 vs. 3 $p = 0,0019$; 2 vs. 3 $p = 0,0286$; 3 vs. 4 $p = 0,0003$; 3 vs. 5 $p = 0,0035$). Hierarchinė *VDR*, *CYP24A1* ir *CYP2R1* genų klasterizacija sergančių RA grupėje pavaizduota 10 pav.

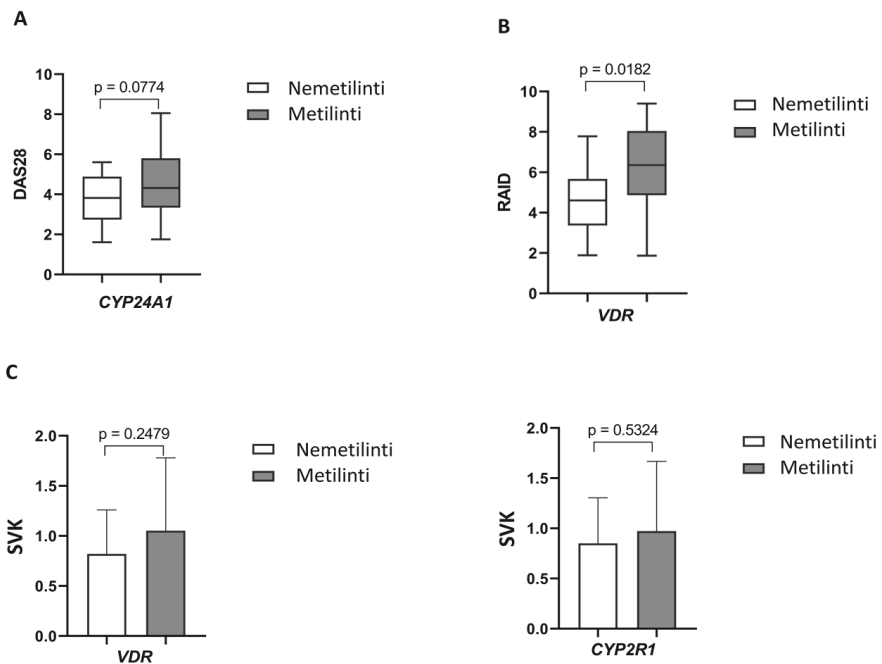


10 pav. *VDR* (A), *CYP24A1* (B), *CYP2R1* (C) CpG pozicijų metilinimo intensyvumo (MI) palyginimas sergančių reumatoidiniu artritu (RA) tiriamųjų grupėje hierarchinės klasterizacijos metodu. Skaičiai x ašyje atspindi atskiras genų CpG pozicijas; skaičiai y ašyje – tiriamuosius; spalvinė skalė nuo mėlynos iki raudonos rodo mažiausias ir didžiausias MI reikšmes.

DNR metilinimo ir sociodemografinių rodiklių sąsajos. Tyrimo metu įvertintos *VDR*, *CYP24A1* ir *CYP2R1* genų metilinimo lygio ir sociodemografinių RA grupės rodiklių sąsajos. *CYP24A1* metilinimo intensyvumas tiesiogiai koreliavo su sergančių RA tiriamųjų amžiumi

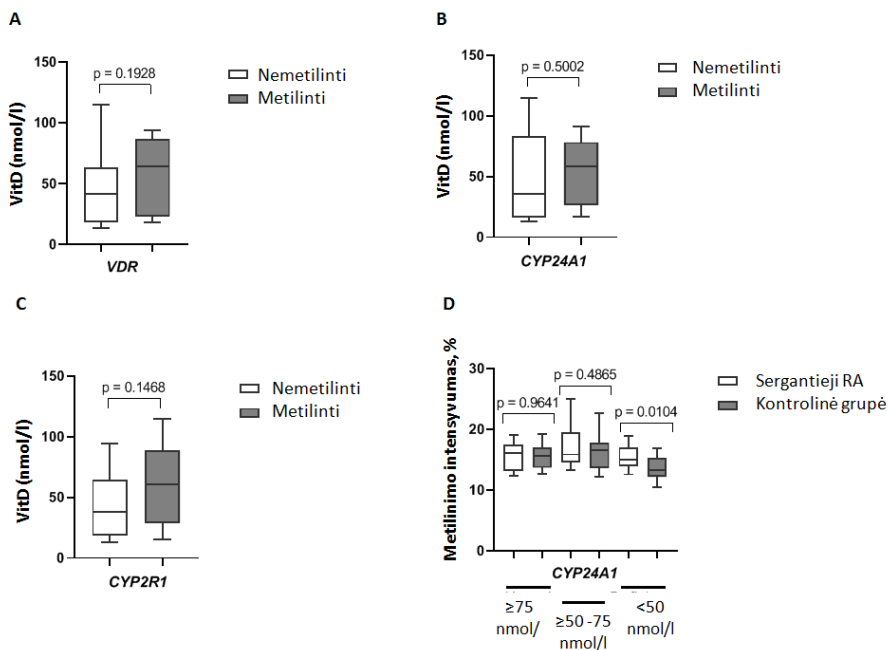
($r=0,519$, $p=0,0017$). Įvertinus *CYP24A1* metilinimo dažnį, nustatyta, kad vyresnio amžiaus sergančių RA tiriamųjų mėginiai buvo labiau metilinti nei jaunesnio amžiaus asmenų ($p<0,01$). Vis dėlto kitų sąsajų tarp DNR metilinimo lygio ir sociodemografinių rodiklių (pvz., lyties, rūkymo, kt.) nebuvo aptikta.

DNR metilinimo ir RA klinikinių parametru sąsajos. Tyrimo rezultatai parodė tendencingai didesnę DAS28 CRB ligos aktyvumą RA tiriamiesiems, kurių *CYP24A1* buvo metilintas, lyginant su nemetilintu geno promotoriumi ($3,71 \pm 0,891$ vs. $4,60 \pm 0,48$, $p=0,0774$) (11 pav., A). Visgi statistškai reikšmingų sąsajų tarp tirtų genų MI ir DAS28 nenustatyta. Kitų RA klinikinių rodiklių analizė parodė, kad didesnis RAID balas buvo susijęs su VDR metilinimo būkle ($4,58 \pm 1,64$ vs. $6,22 \pm 0,66$, $p=0,018$) (11 pav., B), taip pat, didesni SVK balai nustatyti sergantiems RA tiriamiesiems, kurių VDR ($0,82 \pm 0,20$ vs. $1,05 \pm 0,23$) ir *CYP2R1* ($0,85 \pm 0,19$ vs. $0,97 \pm 0,12$) buvo metilinti, tačiau skirtumai nebuvo statistškai reikšmingi ($p>0,05$) (11C pav.).



11 pav. *CYP24A1*, *VDR*, *CYP2R1* metilinimo dažnio ir reumatoidinio artrito (RA) klinikinių parametru palyginimas: DAS28 – ligos aktyvumo indeksas 28 (A); RAID – RA ligos poveikio klausimynas (B); SVK – sveikatos vertinimo klausimynas (C).

DNR metilinimo ir vitamino D sąsajos. Rengiant šį disertacinį darbą nustatyta, kad sergančių RA tiriamųjų, kurių genai buvo metilinti, vitamino D koncentracija buvo didesnė palyginti su nemetilintais DNR mėginiais: *VDR* geno ($57,57 \pm 28,93$ vs. $47,40 \pm 29,88$ nmol/l), *CYP24A1* geno ($53,23 \pm 26,22$ vs. $48,23 \pm 34,41$ nmol/l) ir *CYP2R1* geno ($60,41 \pm 30,73$ vs. $44,54 \pm 27,63$ nmol/l). Nors rasti skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi ($p > 0,05$), tačiau rezultatai rodo, kad minėtų genų metilinimas gali būti susijęs su didesniu vitamino D lygiu kraujo serume (12 pav., A–C). Tą įrodo ir *VDR* geno 8-os pozicijos MI tiesioginė koreliacija su vitamino D koncentracija ($r = 0,3485$, $p = 0,0345$). Įvertinus bendrą *VDR* ir *CYP2R1* metilinimo intensyvumą, taip pat rasta tiesioginė koreliacija su vitamino D koncentracija sergančių RA tiriamųjų grupėje ($p > 0,05$). Palyginus sergančių RA ir kontrolinės grupės duomenis, nustatyta, kad vitamino D stokojantiems (<50 nmol/l) RA pacientams būdingas statistiškai reikšmingai aukštesnis *CYP24A1* metilinimo intensyvumas palyginti su vitamino D stokojančiais sveikais asmenimis ($p = 0,0104$) (12 pav., D).



12 pav. Vitamino D (VitD) koncentracija (nmol/l) ir *VDR* (A), *CYP24A1* (B), *CYP2R1* (C) metilinimo dažnis; *CYP24A1* metilinimo intensyvumo (%) palyginimas pagal vitamino D koncentraciją tarp reumatoidiniu artritu (RA) sergančių ir kontrolinės grupės asmenų (D).

Sergantys RA tiriamieji, kuriems buvo nustatyta pakankama vitamino D koncentracija (≥ 75 nmol/l) ir vitamino D trūkumas, taip pat pasižymėjo didesniu *CYP2R1* MI palyginti su ekvivalentūs vitamino D kiekius turinčiais kontrolinės grupės tiriamaisiais ($p > 0,05$). Visgi, kategorizavus sergančius RA tiriamuosius pagal vitamino D kiekį (normalus kiekis vs. trūkumas, normalus kiekis vs. nepakankamumas ($\geq 50-75$ nmol/l), trūkumas vs. nepakankamumas) statistiškai reikšmingų *VDR*, *CYP24A1* ir *CYP2R1* metilinimo lygio skirtumų neaptikta.

4.5. Lėtinio periodontito ryšys su reumatoidiniu artritu

Periodontologinis ištyrimas VUL Žalgirio klinikoje atliktas 93 RA sergantiems tiriamiesiems. Tyrimo imtį sudarė 84 moterys ir 9 vyrai, vidutinis tiriamųjų amžius įtraukimo į tyrimą metu buvo $54,01 \pm 11,01$ metų ir varijavo nuo 29 iki 75 metų, vidutinė RA ligos trukmė buvo $12,65 \pm 10,38$ metų. Norint įvertinti skirtumus tarp PD sergančių ir periodontologiškai sveikų RA tiriamųjų, sudarytos RA+PD+ (n=63, 67,8 %) ir RA+PD- (n=30, 32,2 %) grupės. RA+PD+ grupė statistiškai reikšmingai buvo susijusi su lytimi, t.y. vyrai dažniau sirgo PD nei moterys ($p=0,029$). Taip pat svarbu paminėti, kad visi periodontologiškai sveiki RA sergantys pacientai buvo nerūkantys ir dažniau naudojo tarpdančių siūlą nei RA+PD+ grupės tiriamieji ($p < 0,05$). Demografinės ir tiriamųjų gyvenamosios įpročių charakteristikos pateiktos 8 lentelėje.

8 lentelė. RA+PD+ ir RA+PD- grupių demografinės ir gyvenamosios įpročių charakteristikos

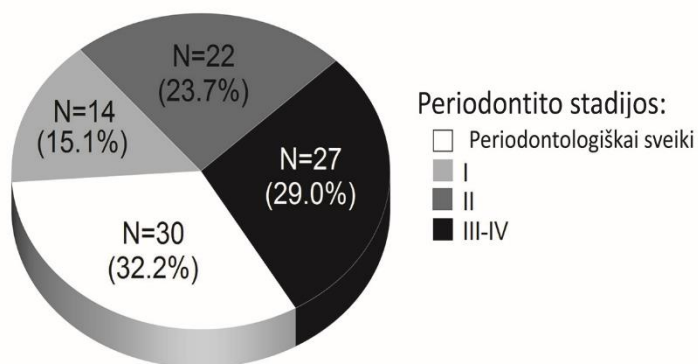
Kintamasis	Iš viso n=93	RA+PD+ grupė n=63 (67,8 %)	RA+PD- grupė n=30 (32,2 %)	<i>p</i> reikšmė
Amžius (metais)	$54,01 \pm 11,01$	$55,33 \pm 9,5$	$51,23 \pm 13,37$	0,168
KMI (kg/m ²)	$24,96 \pm 4,34$	$25,24 \pm 4,39$	$24,38 \pm 4,26$	0,539
Lytis (n, %)				0,029*
moterys	84 (90,32 %)	54 (85,71 %)	30 (100%)	
vyrai	9 (9,68 %)	9 (14,29 %)	0	
Rūkymas (n, %)				0,005*
nerūko	54 (58 %)	36 (57,1 %)	18 (60 %)	
rūko	15 (16,2 %)	15 (23,8 %)	0	
anksčiau rūkė	24 (25,8 %)	12 (19,1 %)	12 (40 %)	

8 lentelės tęsinys

Alkoholio vartojimas (n, %)				0,505
niekada	49 (52,7 %)	31 (49,2 %)	18 (60 %)	
1 kartą per savaitę	5 (5,3 %)	3 (4,8 %)	2 (6,7 %)	
1 kartą per mėnesį	39 (42 %)	29 (46 %)	10 (33,3 %)	
Odontologinė profilaktika (n, %)				0,333
<kartą per metus	16 (17,2%)	12 (10,8%)	4 (13,3%)	
1 k. per metus	54(58%)	38 (60,3%)	16 (53,3%)	
du ir daugiau k. per metus	23 (24,8%)	13 (20,6%)	10 (33,4%)	
Tarpdančių siūlas (n, %)				0,016*
taip	69 (74,2%)	42 (66,7%)	27 (90%)	
ne	24 (25,8%)	21 (33,3%)	3 (10%)	
Dantų valymas dantų šepetėliu/d. (n, %)				0,155
1 kartą	24 (25,8%)	20 (31,7%)	4 (13,3%)	
2 ir daugiau kartų	69 (74,2%)	43 (68,3%)	26 (86,7%)	

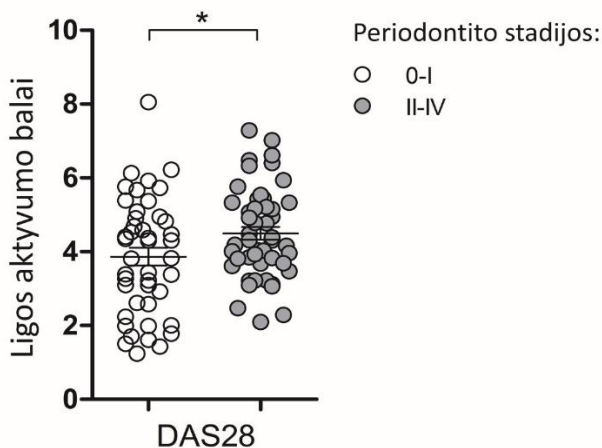
Reikšmės atspindi vidurkį \pm SN (standartinis nuokrypis) arba n, %; KMI – kūno masės indeksas; PD – periodontitas; RA – reumatoidinis artritas; * – statistiškai reikšmingi skirtumai.

Beveik trečdaliui RA sergančių pacientų (n=27, 29,0 %) diagnozuotas sunkus lėtinis ir sunkus pažengęs PD (III+IV stadija). Lėtinio periodontito paplitimas tarp sergančių RA tiriamųjų pavaizduotas 13 pav.



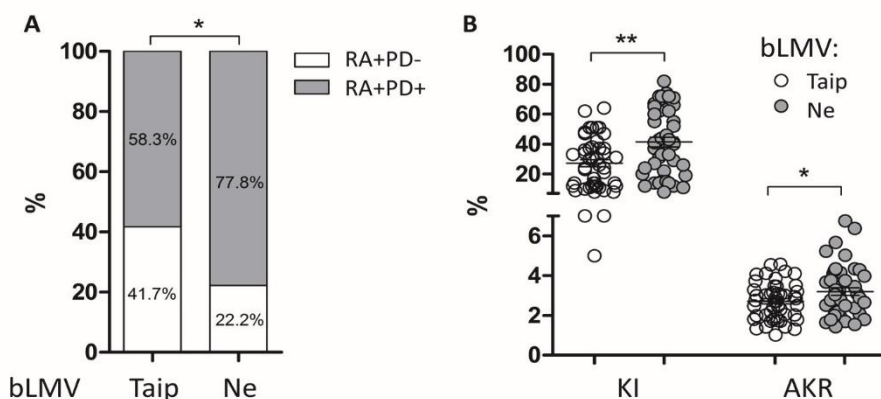
13 pav. Periodontito stadijos tarp sergančių reumatoidiniu artritu.

Lėtinio periodontito ir RA klinikinės sąsajos. RA+PD+ grupės tiriamiesiems, palyginti su RA+PD– grupe buvo nustatytas didesnis RA ligos aktyvumas vertinant DAS28 CRB indeksą ($4,37 \pm 1,28$ vs. $3,82 \pm 1,65$), taip pat didesnė CRB koncentracija (mg/l) ($13,82 \pm 24,44$ vs. $8,44 \pm 12,99$ mg/l), deja, aptikti skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi ($p > 0,05$). Vis dėlto, atlikus detalesnę duomenų analizę, paaiškėjo, kad sergančių vidutinio sunkumo ir sunkiu lėtiniu PD grupėje DAS28 CRB indeksas buvo statistiškai reikšmingai didesnis nei periodontologiškai sveikų ir lengvo lėtinio PD grupės ($4,49 \pm 1,22$ vs. $3,86 \pm 1,58$, $p = 0,033$) (14 pav.), o tai įrodo, kad sunkesnė PD stadija yra susijusi su aktyvesne RA liga. Taip pat RA+PD+ grupės tiriamieji žymėjo didesnes VAS ($45,81 \pm 20,11$ vs. $40,83 \pm 21,75$ mm) vertes ir surinko daugiau RAID klausimyno balų ($4,68 \pm 2,17$ vs. $3,94 \pm 2,44$) nei periodontologiškai sveiki RA grupės asmenys ($p > 0,05$).



14 pav. Ligos aktyvumo indekso 28 (DAS28) palyginimas pagal periodontito (PD) stadijas; * – statistiškai reikšmingi skirtumai, kai $p < 0,05$.

Lėtinio periodontito parametrai RA+PD+ grupėje. RA+PD+ grupės tiriamiesiems periodontologinio įvertinimo metu rasti statistiškai reikšmingai didesni KI, AKR, PNL, ZG periodontito parametrai ($p < 0,001$) ir didesnis netektų dantų skaičius ($p = 0,004$) palyginti su RA+PD– grupės tiriamaisiais. Statistiškai reikšmingo ryšio tarp seropozityvaus RA (teigiami RF/anti-CCP) ir PD diagnozės aptikta nebuvo ($p > 0,05$). Tyrimo metu nustatyta akivaizdi rūkymo ir PD sąsaja: rūkantiems ir anksčiau rūkiusiems RA pacientams taip pat nustatyti aukštesni KI, AKR, PNL, ZG periodontito parametrai, palyginti su niekada nerūkiusiais RA+PD+ tiriamaisiais. Panašūs pokyčiai buvo būdingi ir vyresniems RA sergantiems pacientams ($p < 0,05$), vyresnis amžius taip pat buvo susijęs su vidutinio sunkumo ir sunkiu lėtiniu PD ($p = 0,006$). Įdomu, kad 48 (51,6 %) RA sergantiems pacientams, kurie buvo gydyti bLMV ar bLVM kartu su tradiciniais sintetiniais LMV, nustatyti mažesni KI ir AKR periodontito parametrai ($p < 0,05$). Taip pat šios grupės pacientams lėtinio PD diagnozė buvo patvirtinta statistiškai reikšmingai rečiau nei tik tradiciniais sintetiniais LMV gydytiems pacientams ($p < 0,05$) (15 pav. A, B).



15 pav. Biologinių ligų modifikuojančių vaistų (bLMV) ryšys su periodontitu (PD) **(A)** bLMV ryšys su kraujavimo indeksu (KI) ir alveolinio kaulo rezorbcija (AKR) **(B)** sergančiųjų reumatoidiniu artritu (RA) grupėje; ** – statistiškai reikšmingi skirtumai, kai $p < 0,001$; * – kai $p < 0,05$.

Vitamino D, reumatoidinio artrito ir periodontito ryšys. Tirtose periodontologiškai įvertintų sergančių RA pacientų imtyje nustatytas didelis vitamino D trūkumo/nepakankamumo ($< 75 \text{ nmol/l}$) paplitimas, siekiantis 90,4 % ($n=80$). Vidutinė vitamino D koncentracija kraujo serume buvo $45,65 \pm 21,33 \text{ nmol/l}$. Periodontologiškai sveikų RA pacientų grupėje nustatytos tendencingai didesnės 25(OH)D reikšmės, palyginti su periodontitu sergančiais tiriamaisiais ($48,13 \pm 27,47$ vs. $44,48 \pm 17,82 \text{ nmol/l}$, $p > 0,05$). Taip pat aptikta statistiškai reikšmingai mažesnė vitamino D koncentracija RA+PD+ grupėje, kuriai diagnozuotas pažengęs sunkus lėtinis PD (IV stadija), palyginti su vidutinio sunkumo PD (II stadija) ($39,61 \pm 17,12$ vs. $52,07 \pm 18,23 \text{ nmol/l}$, $p=0,031$) grupe. Tyrimo duomenys leidžia daryti prielaidą, kad didesnė vitamino D koncentracija yra susijusi su geresnėmis PD išeitimis RA sergantiems pacientams.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

5.1. Vitamino D reikšmė ir VDR geno polimorfizmų dažnis tarp reumatoidiniu artritu sergančių pacientų tirtose Lietuvos populiacijoje

Pastaraisiais dešimtmečiais vitamino D įtaka RA patogenezėje ir jo ryšys su ligos klinicine eiga buvo tirti eksperimentiniuose, atvejo kontrolės ir klinikiniuose vitamino D papildų vartojimo tyrimuose. Mokslinėje literatūroje pateikiami rezultatai yra kontroversiški ir skiriasi – priklauso nuo geografinio

regiono, etninės grupės, vertintų aplinkos veiksnių, tyrimo dizaino. Vis dėlto atliktais eksperimentiniais *in vivo* ir *in vitro* tyrimais buvo įrodyta, kad RA patogenezėje dalyvaujančios imuninės sistemos ląstelės yra jautrios aktyviai vitamino D formai $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ir netiesiogiai lemia priešūždegiminį atsaką, pasireiškiantį sumažėjusia į fibroblastus panašių sinoviocitų proliferacija, taip pat sumažėjusia osteoklastų sąlygota kaulo ir kremzlės destrukcija bei prouždegiminių citokinų kiekio gamyba [131, 213]. Gyvūnų modelio tyrimo metu, sutrikęs VDR signalinis kelias eksperimentinėms lėtiniu artritu sergančioms pelėms sukėlė greitesnį erozinio artrito progresavimą [214]. Rengiant šį disertacinį darbą analizuotas vitamino D trūkumo paplitimo mastas tarp RA sergančių pacientų, jo įtaka ligos eigai, įvertintas VDR geno polimorfizmų dažnis RA populiacijoje.

Nors dalis sergančių RA pacientų vartojo vitamino D papildus, mūsų tyrimo rezultatai parodė didelį vitamino D trūkumo paplitimą tarp RA pacientų, šio vitamino trūkumas nustatytas 62,62 % tiriamųjų. Vitamino D trūkumas yra galbūt susijęs su padidėjusia rizika sirgti RA, ligos aktyvumu, blogesne fizine pacientų sveikata, gyvenimo kokybe. G.G. Song ir bendraautorių atliktoje iš 215 757 tiriamųjų ir 874 atsitiktinių RA atvejų metaanalizėje buvo nustatyta, kad vitamino D papildų vartojimas yra susijęs su 24,2 % mažesne rizika sirgti RA [137]. Kito didelio masto stebėjimo – skerspjuvio tyrimo (COMORA, angl. *Comorbidities in Rheumatoid arthritis*), vykusio 15-oje pasaulio valstybių, rezultatai parodė net 71 % vitamino D nepakankamumo paplitimą tarp korėjiečių ir tik 36 % tarp Italijos RA sergančių pacientų [215]. Panašūs rezultatai pateikti ir multicentriniame pilotiniame 13 Europos valstybių tyrime, kuriame 625 RA pacientams ir 276 pagal amžių ir lytį atrinktiems sveikiems kontrolinės grupės tiriamiesiems buvo vertintas vitamino D kiekis. Doktorantė E. Pucevičienė ir prof. I. Butrimienė buvo šio EULAR finansuoto tyrimo tyrėjos, taip pat projekto straipsnių bendraautorės. Tyrimo duomenimis, vitamino D trūkumas (<20 ng/ml) nustatytas beveik 66 % RA sergančių tiriamųjų, taip pat įvertinti skirtumai tarp skirtingų Europos kraštų: ispanų populiacija pasižymėjo didesniu vitamino D kiekiu, palyginti su Lietuvos, Latvijos ir Lenkijos tiriamaisiais [5]. Pateikti rezultatai rodo skirtingą vitamino D trūkumo paplitimą tarp geografinių regionų, įskaitant ir Lietuvą.

Svarbu paminėti, kad rengiant šį disertacinį darbą nustatyti statistiškai reikšmingi vitamino D kiekio skirtumai tarp sergančių RA ir kontrolinės grupės tiriamųjų, taip pat neigiama vitamino D ir ligos aktyvumo (DAS28) bei fizinės sveikatos (SVK) koreliacija sutampa su aprašytais kitų autorių

publikuotuose tyrimuose ir metaanalizėse [5, 6, 137, 149, 215, 216]. 2017 m. publikuoto klinikinio tyrimo duomenimis, 3 mėnesius taikytas gydymas vitamino D papildais reikšmingai sumažino RA ligos aktyvumą vertinant pagal DAS28 CRB indeksą [159]. Vis dėlto panašaus dizaino tyrimų rezultatai skiriasi. Vitamino D kiekio skirtumų tarp sergančių RA ir kontrolinės grupės tiriamųjų ir koreliacijos su ligos aktyvumu nedidelės imties lenkų populiacijos tyrime nebuvo rasta [217]. Panašius duomenis yra paskelbęs ir Higginsas su bendraautoriais – tyrimo duomenimis, mažesnis vitamino D kiekis koreliavo su didesne VAS verte, bet ne su DAS28 balu [218].

Šio tyrimo metu atlikta genetinė *VDR* polimorfizmų analizė padidėjusios rizikos sirgti RA ir sąsajų su atskirais genetiniais variantais nenustatė, reikšmingų skirtumų tarp sergančių RA ir kontrolinės grupės tiriamųjų vertinant alelių ir genotipų pasiskirstymo dažnį taip pat nebuvo rasta. Remiantis šiais duomenimis, hipotezė, kad *VDR* polimorfizmai yra susiję su padidėjusia rizika sirgti RA Lietuvos populiacijoje mūsų tyrime nebuvo patvirtinta. Panašius rezultatus yra publikavę ir kitų Europos šalių tyrėjai. Nedidelės imties italų, ispanų ir vokiečių populiacijos tyrimuose nebuvo rasta sąsajų tarp tiriamųjų *VDR* polimorfizmų dažnio ir RA predispozicijos [184, 219, 220]. Tik *TaqI tt* genotipas siejosi su jaunesniu susirgimo RA amžiumi nei *TT* ir *Tt* genotipai [184]. Platus rezultatų spektras yra pateiktas ir keliuose metaanalizėse, apimančiose skirtingų geografinių regionų tyrimus [13, 181, 221]. G.G. Song ir bendra autorių atliktoje iš 7 tyrimų surinktų duomenų metaanalizėje sąsajų tarp RA ir *VDR* geno polimorfizmų nenustatyta ($\text{ŠS}=1,1740$, 95%, $\text{CI}=0,994-1,387$, $p=0,059$). Visgi, suskirsčius tiriamuosius pagal etninę kilmę, rasta statistiškai reikšminga *F* alelio ir RA sąsaja europiečiams ($\text{ŠS}=1,402$, 95%, $\text{CI}=1,126-1,746$, $p=0,003$) [13]. Tokie pat rezultatai buvo publikuoti ir kitoje metaanalizėje, apimančioje 4 Azijos ir 5 Europos tyrimų bei prancūzų RA populiacijos tyrimo duomenis [181, 221]. Susidomėjimas genetinių *VDR* variantų tyrimais ir RA predispozicija greičiausiai kilo dėl dalinės ne HLA genetinės RA etiologijos bei *VDR* įtakos vitamino D funkcijai, šiam veikiant per *VDR*, esančius monocituose, aktyvuotuose limfocituose ir kitose imuninės sistemos ląstelėse, dalyvaujančiose sąnario uždegimo procese [222].

Tam tikrų *VDR* genotipų įtaką vitamino D metabolizmui įrodo ir šiame tyrime gauti rezultatai. Tendencingai didesnė vitamino D koncentracija buvo nustatyta *TaqI tt* ir *BsmI bb* genotipų sergančiųjų RA grupėje palyginti su kitais *VDR* genotipais, o tuos pačius *FokI ff*, *TaqI tt* ir *BsmI bb* genotipus turintiems sergantiems RA ir kontrolinės grupės asmenims buvo būdinga

panaši vitamino D koncentracija. Vis dėlto statistiškai reikšmingų sąsajų tarp *VDR* polimorfizmų ir ligos aktyvumo ar fizinės sveikatos rodiklių nebuvo nustatyta. Priešingai šio tyrimo duomenims, neseniai publikuotoje analizėje nustatyta, kad vitamino D trūkumas buvo susijęs su didesniu DAS28 CRB ligos aktyvumu, SVK ir didesniu pažeistų sąnarių skaičiumi išskirtinai *FokI Ff/ff* genotipo RA grupėje ($p < 0,05$). Nors vertinant visą tyrimo imtį reikšmingų sąsajų tarp vitamino D koncentracijos ir ligos aktyvumo nebuvo rasta [223]. Yra žinoma, kad *FokI* ir *BsmI* yra priskiriami prie funkcionuojančių *VDR* geno regionų, o *FokI* lemia skirtingo ilgio baltymų produkciją. Trumpasis *F* alelio baltymas yra aktyvesnis ir susijęs su mažesnėmis vitamino D koncentracijomis, palyginti su *f* aleliu [224]. Šią tendenciją patvirtina ir kiti atlikti tyrimai, kuriuose didesnis vitamino D kiekis nustatytas turintiems *ff* genotipą [225, 226]. Homozigotinis trumpojo baltymo *FF* genotipas, aptinkamas žmogaus monocituose ir dendritinėse ląstelėse, po stimuliacijos interferonu (IFN)- γ , lėmė didesnę IL-12 raišką (vertinant IL-12p40, IL12p35 ir IL-12p70 baltymus), palyginti su *ff* genotipo ląstelėmis. Tai rodo, kad *FokI* polimorfizmai veikia imuninių ląstelių funkciją ir galbūt dalyvauja autoimuninių ligų patogenezėje [227].

Atliktame tyrime sudarytos grupės yra homogeniškos, bet, nepaisant aptiktų reikšmingų asociacijų, tyrimas turi ir keletą trūkumų. Statistiškai nereikšmingus *VDR* geno polimorfizmų analizės rezultatus galėjo nulemti sąlyginai nedidelė tiriamųjų imtis, neatspindėjusi visos populiacijos duomenų. Vis dėlto žinant, kad sergamumas RA Lietuvoje yra apie 15 tūkstančių pacientų, didesnės apimties tyrimai reikalautų daug laiko sąnaudų ir finansinių išteklių. Kita vertus, atliktas tyrimas įrodo etninius genetinius skirtumus ir paneigia *VDR* geno polimorfizmų sąsają su RA etiopatogeneze. Be to, aptiktos *VDR* polimorfizmų ir vitamino D sąsajos rodo genetinę vitamino D reguliacijos kilmę.

5.2. Vitamino D atsako kelio genų metilinimo sąsajos su reumatoidiniu artritu ir vitamino D kiekiu

Ryšys tarp reumatoidinio artrito ir epigenetinių modifikacijų, t.y. DNR metilinimo, vykstančio ligos paveiktose ląstelėse ir audiniuose, taip pat periferinio kraujo ląstelėse, yra plačiai tiriamas ir aprašomas mokslinėse publikacijose. Sukaupiti duomenys leidžia manyti, kad epigenetiniai veiksniai dalyvauja sudėtinguose RA ligos mechanizmuose, gali būti potencialiai vertinami kaip biožymenys arba net naudojami taikinių terapijai [79, 97]. Vitaminas D, veikdamas kaip imunomodulatorius ir gebantis daryti įtaką skirtingų ląstelių „elgesio“ mechanizmams, taip pat gali būti epigenetiškai

paveikus ir dalyvauti RA patogenezėje [14, 97, 122]. Vis dėlto iki šiol nebuvo atlikta tyrimų, kurie analizuotų vitamino D atsako kelio genų metilinimą RA sergantiems pacientams.

Atlikto tyrimo metu buvo nustatytas panašus vitamino D apykaitos genų metilinimo lygis tarp RA ir kontrolinės grupės tiriamųjų. Vertinant abi grupes bendras metilinimo lygis buvo žemas, tik *CYP24A1* geno metilinimo intensyvumas buvo statistiškai reikšmingai didesnis palyginti su *VDR* ir *CYP2R1* genais, ir siekė nuo 15 iki 17 %. Mūsų tyrimo duomenys sutampa su Behčeto ligos atveju tirtu *VDR* metilinimo profiliu, kuris nesiskyrė tarp sergančių ir sveikų asmenų [228]. Analogiškai, E.L. Beckett ir bendraautorių atlikto tyrimo metu tirtų *CYP2R1*, *CYP27B1*, *CYP24A1* ir *VDR* genų metilinimo lygis taip pat buvo žemas [200]. Rengiant šį disertacinį darbą nustatytas reikšmingai aukštesnis *CYP24A1* geno metilinimo lygis gali būti susijęs su dideliu vitamino D trūkumo pasireiškimu abiejose tiriamosiose grupėse. *CYP24A1* hipermetilinimas lemia sumažėjusią geno raišką, o kartu slopina aktyvios vitamino D formos inaktivaciją. Kita vertus, mažas *CYP2R1* ir *VDR* metilinimo intensyvumas rodo aktyvią geno raišką ir netiesiogiai indikuoja apie aktyvų vitamino D metabolizmo procesą.

Iškelta hipotezė patvirtina ir mūsų tyrimo metu nustatyta sąsaja tarp metilintų *VDR*, *CYP24A1* ir *CYP2R1* genų ir didesnių vitamino D koncentracijų, taip pat RA pacientų grupėje rasta teigiama *VDR*, *CYP2R1* metilinimo intensyvumo ir vitamino D kiekio koreliacija. Šio darbo rezultatai sutampa su H. Zhu ir bendraautorių publikuotu tyrimu: asmenims, kuriems buvo nustatytas išreikštas vitamino D trūkumas ($25(\text{OH})\text{D} \leq 25 \text{ nmol/l}$), buvo būdingas sumažėjęs metilinimo lygis *CYP2R1*, *CYP24A1* ir *DHCR7* genuose palyginti su kontrolinės grupės tiriamaisiais, kurių vitamino D koncentracija buvo normali ($25(\text{OH})\text{D} > 75 \text{ nmol/l}$) [203]. E. L. Beckett ir bendraautoriai taip pat nustatė teigiamą vitamino D kiekio ir *VDR* metilinimo lygio koreliaciją, o *CYP2R1* ir *CYP24A1* metilinimas, skirtingai nei mūsų duomenimis, atvirkščiai koreliavo su vitamino D koncentracija [200]. Klinikinis intervencinis kalcio ir vitamino D papildų (1100 TV/d) tyrimas taip pat nustatė, kad vidutinis *CYP2R1* ir *CYP24A1* genų metilinimo lygis neigiamai koreliavo su papildų fone didėjančiu serumo $25(\text{OH})\text{D}$ kiekiu. Įdomu, kad tiriamiesiems, kuriems papildų vartojimas nepadėjo normalizuoti vitamino D koncentracijos serume, tyrimo pradžioje išmatuotas statistiškai reikšmingai aukštesnis *CYP2R1* ir *CYP24A1* metilinimo lygis palyginti su tiriamaisiais, kuriems gydymas buvo veiksmingas. Tai įrodo, kad bazinis įvadytų genų metilinimo lygis gali padėti numatyti papildų vartojimo efektyvumą [204]. Taigi remiantis šio ir kitų tyrimų duomenimis, *CYP24A1*,

CYP2R1, *VDR* metilinimo profilio ir vitamino D sąsajos įrodo vitamino D ir epigenomo ryšį.

Kategorizavus grupes pagal vitamino D kiekį, atlikta išsamesnė duomenų analizė atskleidė statistiškai reikšmingus skirtumus tarp tiriamųjų. RA sergantiems pacientams, kuriems buvo nustatytas vitamino D trūkumas (<50 nmol/l), aptiktas didesnis *CYP2R1* ir *CYP24A1* metilinimo intensyvumas, palyginti su kontroline, vitamino D stokojančia grupe (25(OH)D <50 nmol/l). Normos ribose vitamino D koncentraciją (≥75 nmol/l) turinčių RA sergančių tiriamųjų *CYP2R1* metilinimo lygis taip pat buvo aukštesnis nei ekvivalentų vitamino D kiekį turinčių kontrolinių asmenų pogrupis. Ir nors RA būdingesnis globalus DNR hipometilinimas nei hipermetilinimas, ypač stebimas periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse ir sinovijos fibroblastuose [89, 96], tačiau mūsų tyrime nustatyti metilinimo pokyčiai leidžia svarstyti apie galimas vitamino D trūkumo priežastis RA sergantiems pacientams. Didesnis DNR metilinimo intensyvumas lemia vitamino D apykaitos fermentų hipoprodukciją, sąlygotą genų raiškos slopinimo, ir mažą vitamino D kiekį organizme.

Nors tiriamųjų grupės buvo vienalytės, sudarytos pagal amžių ir vitamino D kiekį, tačiau statistiškai reikšmingų skirtumų tarp sergančių RA ir kontrolinės grupės asmenų bendroje imtyje nenustatyta, išskyrus tam tikrus skirtumus rastus lyginant pogrupius pagal vitamino D koncentraciją. Gauti duomenys įrodo, kad vitamino D apykaitos genų metilinimo būklė yra netiesiogiai susijusi su vitamino D trūkumu sergant RA. Taip pat žinant, kad 25(OH)D metabolizavimo fermentai, išskyrus *VDR*, yra dažniau aptinkami kitose nei periferinio kraujo ląstelėse [122], galima daryti prielaidą, kad tirtų genų metilinimo profilis gali varijuoti atsižvelgiant į tiriamą audinį ir ląsteles.

Kaip neišvengiamą šio tyrimo etapo trūkumą galima įvardyti sąlyginai nedidelį tiriamosios imties dydį ir aukštą vitamino D stokos paplitimą tarp abiejų tiriamųjų (sergančių RA ir kontrolinės) grupių. Minėti veiksniai galėjo turėti įtakos analizuotų duomenų statistiniam reikšmingumui. Kadangi *VDR*, *CYP24A1*, *CYP2R1* genų metilinimo tyrimai RA atveju pasaulyje iki šiol nebuvo atlikti, norėdami apskaičiuoti reikiamą imties dydį literatūros duomenimis remtis negalėjome. Todėl imties dydį apskaičiavome teoriškai. Gavus pirminius rezultatus paaiškėjo, kad metilinimo lygis ir atvejų (RA sergančių ligonių), ir kontrolinės grupės imtyse yra žemas ir skiriasi nedaug, tad, siekiant išlaikyti norimą kriterijaus galią ir reikšmingumo lygmenį, abi grupes turėtų sudaryti beveik po 300 tiriamųjų. Kadangi gauti pradiniai DNR metilinimo rezultatai reikšmingų skirtumų neparodė, o reikiamas imties dydis buvo didesnis nei planuojamas biomedicininio tyrimo bioetikos protokole ir ribojamas finansinių išteklių, detalesnė metilinimo analizė buvo atlikta

tiriamuosius suskirstant pagal vieną iš labiausiai išsiskyrusių klinikinių rodiklių – vitamino D kiekį. Svarbu paminėti, kad gauti rezultatai nurodo tokių tyrimų poreikį ateityje.

5.3. Lėtinio periodontito ir reumatoidinio artrito sąsajos

Reumatoidinio artrito ir periodontito ryšys pastaruoju metu yra gana plačiai nagrinėjimas ypač dėl ligų patogenezės mechanizmų sąsajų, taip pat periodontitui patognominės bakterijos *P. gingivalis* išskiriamo fermento PPAD4 gebėjimo citrulinizuoti žinduolių baltymus ir galimo dalyvavimo RA patogenezėje. Deja, bet skirtingų tyrimų, analizavusių šių patologijų ryšį, rezultatai nesutampa. Šis mokslinis tyrimas nagrinėjo RA ligos klinikinių rodiklių sąsajas su jau patvirtintu PD, atsižvelgiant į vitamino D ir sociodemografinių veiksnių įtaką. Atlikus pirminę RA+PD+ ir RA+PD– grupių analizę ir vertinant RA klinikinius parametrus, statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių nebuvo rasta. Vis dėlto, atlikę statistinius skaičiavimus RA+PD+ grupės viduje, gavome reikšmingų sąsajų tarp RA ligos aktyvumo ir PD sunkumo (didesnės stadijos), taip pat duomenų apie vitamino D trūkumo įtaką RA ir PD bei šių ligų tarpusavio ryšiui. Mūsų žiniomis, iki šiol yra publikuoti tik pavieniai tyrimai, vertinę vitamino D ryšį su šiomis uždegiminėmis ligomis.

Tyrimu nustatėme, kad PD yra plačiai paplitusi tarp sergančių autoimuniniu artritu liga. Po išsamaus periodontologinio ištyrimo PD diagnozuotas 67,8 % RA sergančių pacientų, iš kurių beveik trečdaliui nustatyta sunki PD (III+IV) stadija. Neseniai atlikto Suomijos mokslininkų stebėjimo tyrimo duomenimis, PD taip pat diagnozuotas 80 % ankstyvu RA ir net 85 % lėtinio RA sergančių pacientų [38]. Panašius rezultatus publikavo ir Kinijos tyrėjai, PD diagnozę patvirtinę 68 % RA tiriamųjų; jie taip pat įvertino, kad tikimybė sirgti PD sergantiems artritu yra 5 kartus didesnė nei sveikiems asmenims [229]. Tačiau atliktas Korėjos Nacionalinio sveikatos draudimo tyrimas, vertinęs 559 280 tiriamųjų imtį, nustatė, kad PD serga tik 20 % sergančiųjų RA. Visgi rizika susirgti RA buvo didesnė sergantiems PD, nei kontrolinės grupės tiriamiesiems (ŠS 1,22, $p < 0,001$) [230]. Mūsų tyrimo metu rastas didelis sergamumas sunkiu PD (29 %) sergančiųjų RA grupėje yra didesnis palyginti su bendra populiacija. Kaip pateikiama Kassebaum ir kolegų atliktoje apžvalgoje ir metaregresinėje analizėje, pagal amžių standartizuoto sunkaus PD dažnis yra 11,2 % [231]. Didesnis sergamumas PD gali būti nulemtas sutrikusios šeimininko imuninės sistemos gynybos funkcijos sergant RA, tai patvirtina ir mūsų rezultatai.

RA pacientai sergantys vidutinio sunkumo ir sunkiu PD, turėjo statistiškai reikšmingai didesnę DAS28 CRB ligos aktyvumo indeksą. Be to, RA+PD+ grupės tiriamieji savo būklę, apibrėžtą VAS ir RAID, tendencingai vertino kaip sunkesnę. Šiai pacientų grupei taip pat buvo nustatytos blogesnės PD parametrų vertės palyginti su periodontologiškai sveikais RA sergančiais tiriamaisiais. Anksčiau atliktų tyrimų duomenys sutampa su mūsų darbo rezultatais, rodančiais, kad egzistuoja tarppatologinis PD sunkumo ir RA ligos aktyvumo ryšys [232, 233]. Vis dėlto yra ir prieštaraujančių mūsų rezultatams duomenų: nedidelės imties, 40 sergančių RA tiriamųjų analize nebuvo nustatyta ryšio tarp RA aktyvumo ir PD sunkumo, taip pat tarp CRB ar SVK kintamųjų, nors autoriai patvirtino, kad seropozityvus RA (anti-CCP teigiami titrai) buvo susijęs su vidutinio sunkumo ir sunkiu periodontitu [234]. Pažymėtina, kad aktyvus RA ir pažengęs PD yra susiję su padidėjusiais išsiskiriančių uždegiminių biožymenų ir mediatorių kiekiais (ypač CRB, IL-6, TNF- α , MMP, kt.) [235] ir pagrindžia mūsų rezultatų kilmę. Padidėjęs sisteminis uždegimas skatina PD, ir atvirkščiai, PD taip pat lemia uždegimiškumą. Kaip pateikiama „dviejų smūgių“ (angl. „two-hit“) teorijoje, periodonto disbiotinė mikrobinė bioplėvelė sukelia pirmąjį „smūgį“ – destruktinių įvykių kaskadą sergant lėtiniu PD; antrasis „smūgis“, skatinantis sisteminį uždegiminį atsaką, yra sąlygojamas sisteminių ligų, tokių kaip RA [236].

Svarbu paminėti, kad tyrimo metu nustatytas statistiškai reikšmingas ir naudingas ryšys tarp bLMV skiriamų RA gydymui ir periodontito parametrų (KI ir AKR). Pacientams, gydytiems bLMV ar bLMV kombinacija su tradiciniais sintetiniais LMV, periodontitas buvo diagnozuojamas rečiau nei gydomiems tik tradiciniais sintetiniais LMV. Kadangi žinoma, kad RA sergantiems asmenims yra nustatomi didesni citokinų IL-6, TNF- α kiekiai burnos skysčiuose ir kraujo plazmoje, o padidėjusi B ir plazminių ląstelių infiltracija yra susijusi su progresuojančia periodonto kaulinio audinio rezorbcija ir lėtiniu periodontitu [237, 238], todėl slopinantis PD uždegimą bLMV gydymo efektas gali būti logiškai paaiškinamas. Mūsų teiginių sustiprina ir 2020 m. publikuotas straipsnis, paremtas ankstesnių tyrimų duomenimis, kuriame rašoma apie teigiamą TNF- α inhibitorių, IL-6R inhibitorių ir į anti-B limfocitų funkcijas nukreipto gydymo poveikį periodontitui [239]. Gydymas TNF- α inhibitoriais taip pat teigiamai veikė KI, ZG, PNL ir dantenu indeksu parametrus skiriant gydymą biologine terapija nuo 6 savaičių iki 9 mėnesių, kaip rašoma Zamri ir kolegų sisteminėje apžvalgoje [240]. Vis dėlto siekiant palaikyti šią teoriją trūksta duomenų, nes

kai kurie tyrimai teigia, kad PD netgi gali kliudyti gydymui bLMV pasiekti terapinį efektą sergantiems RA [241, 242].

Visuotinai įrodyta, kad rūkymas yra tiek RA, tiek PD rizikos veiksnys [39, 243, 244], taip pat siejantis abi šias patologijas. Mūsų tyrimo rezultatai įrodė, kad rūkymas statistiškai reikšmingai buvo susijęs su RA+PD+ grupe palyginti su periodontologiškai sveikais RA sergančiais asmenimis. Be išimties visi periodontitu nesergantys RA pacientai buvo nerūkantys, o beveik ketvirtadalis RA+PD+ grupės tiriamųjų buvo rūkoriai. Rūkančiųjų ir vyresnio amžiaus pacientų burnos sveikatos rodikliai buvo blogesni, jiems nustatyti didesni PNL, ZG, KI, AKR periodontito parametrai.

Kaip jau aptarta anksčiau, norint palaikyti optimalią vitamino D funkciją kaulų ir kalcio apykaitai ir bendrą teigiamą poveikį sveikatai, 25(OH)D koncentracija kraujo serume turėtų būti didesnė nei 75 nmol/l [116]. Lyginant su anksčiau publikuotais duomenimis [245], mūsų tirtoje 93 pacientų imtyje apie 90 % tiriamųjų buvo nustatytas vitamino D nepakankamumas arba trūkumas. Skerspjuvio stebėjimo modelių tyrimai teigia, kad vitamino D trūkumas ir mažesnis vitamino D papildų vartojimas yra susijęs su padidėjusia rizika sirgti RA ir lėtiniu PD [137, 246]. Mūsų tyrimo metu pastebėta tendencija, kad sergantys periodontitu RA pacientai pasižymi mažesniais vitamino D koncentracijomis kraujo serume nei periodontologiškai sveiki RA tiriamieji. Reikšmingai mažesnis vitamino D kiekis buvo nustatytas RA+PD+ grupei, kuriai diagnozuotas sunkus pažengęs PD (IV stadija) palyginti su vidutinio sunkumo PD (II stadija). Šis rezultatas gali būti paaiškinamas numanomu suminiu abiejų ligų sisteminiu uždegiminiu poveikiu ir patvirtina teiginį, kad vitamino D trūkumas ir kartu egzistuojantys kiti rizikos veiksniai gali paskatinti periodontopatinių bakterijų dauginimąsi ir pabloginti ligos eigą [246].

Tikėtina, kad visoje imtyje nustatyta maža vitamino D koncentracija galėjo turėti įtakos statistinių skaičiavimų reikšmingumo trūkumui tarp RA+PD+ ir RA+PD- grupių. Įtakos statistinių skaičiavimų rezultatams galėjo turėti ir sąlyginai maža 93 tiriamųjų grupė bei RA+PD+ (n=63) ir RA+PD- (n=30) grupių imčių netolygumas. Visgi tai galėtų būti paaiškinama dideliu sergamumu PD tarp RA pacientų. Tyrimo metu stebima lyčių imties disproporcija greičiausiai susidarė dėl didesnio RA paplitimo tarp moteriškosios lyties atstovų, taip pat dėl to, kad į periodontologiškai sveikų RA asmenų grupę nebuvo įtrauktas nė vienas vyras. Todėl rezultatuose gautą reikšmingą sergamumo PD skirtumą tarp lyčių reikėtų vertinti kritiškai. Kitas

šio tyrimo etapo trūkumas – didelio masto vitamino D stoka nustatyta tirtoje kohortoje, kuri, tikriausiai, yra nulemta Lietuvos geografinės padėties.

Vertinant skirtingų tyrimo etapų rezultatus, taip pat galima teigti, kad dėl atlikto atvejo kontrolės ir skerspjūvio tyrimo modelio nebuvo galima įvertinti ekspozicinių veiksnių priežastingumo su RA išėjimais, tik galimybė sužinoti galimas sąsajas ir rizikos veiksnių paplitimą. Visgi atlikto tyrimo nauda yra neabejotina, nes surinkti duomenys papildė žinias apie vitamino D, *VDR* geno polimorfizmą, epigenetinių modifikacijų vitamino D apykaitos genuose ir lėtinio periodontito ryšį su reumatoidiniu artritu.

6. IŠVADOS

1. Reumatoidiniu artritu sergantiems pacientams būdinga reikšmingai mažesnė vitamino D koncentracija nei sveikiems asmenims ($44,96 \pm 21,92$ vs. $54,90 \pm 22,82$ nmol/l, $p < 0,0001$). Mažesnė nei optimali vitamino D koncentracija (< 75 nmol/l) nustatyta 90,29 % RA sergančių tiriamųjų ir yra susijusi su aukštesniu reumatoidinio artrito ligos aktyvumu (DAS28 CRB indeksas) ($p = 0,0017$) ir blogesne fizine sveikata (SVK) ($p = 0,0065$).
2. *VDR* geno polimorfizmai nėra susiję su padidėjusia rizika sirgti reumatoidiniu artritu tirtoje Lietuvos populiacijos imtyje, bet tam tikri genotipai gali turėti įtakos vitamino D kiekiui organizme.
3. Bendras vitamino D atsako kelio genų (*VDR*, *CYP24A1*, *CYP2R1*) metilinimo lygis yra žemas ir tiesiogiai koreliuoja su vitamino D koncentracija kraujo serume. Aukštesnis nei kontrolinės grupės *CYP24A1* ir *CYP2R1* metilinimo lygis esant vitamino D trūkumui ir normai galbūt daro netiesioginę įtaką vitamino D kiekiui sergant reumatoidiniu artritu.
4. Nustatytas didelis (67,8 %) reumatoidiniu artritu sergančių pacientų sergamumas periodontitu, beveik trečdaliui (29 %) jų diagnozuota sunki periodontito (III+IV) stadija. Reikšmingai didesnis reumatoidinio artrito ligos aktyvumas (vertinant DAS28 CRB indeksą) yra susijęs su vidutinio sunkumo ir sunkiu periodontitu ($p = 0,033$).

7. PRAKTIŠKŲ DARBO VERTĖ

Pastaraisiais dešimtmečiais RA gydymo galimybės išsiplėtė. Gydymas tradiciniais sintetiniais ir ypač biologiniais ligą modifikuojančiais vaistais gydytojo reumatologo praktikoje didžiąjai daliai RA sergančių pacientų leidžia pasiekti nedidelį ligos aktyvumą arba remisiją. Vis dėl to šio autoimuninio artrito gydymas turi būti kompleksinis, paremtas ne tik medikamentinio LMV gydymo skyrimu, bet ir apimti būklių, galinčių moduluoti artrito eigą, ištyrimą ir gydymą. Kaip pabrėžiama disertacijos literatūros apžvalgoje, vitaminas D pasižymi įrodytu sisteminiu imunomoduliuojančiu, priešuždegiminiu poveikiu, yra svarbus reguliuojant imuninės sistemos ląsteles, dalyvaujančias RA patogenezėje. Remdamiesi šio mokslinio darbo rezultatais galime teigti, kad vitamino D stoka koreliuoja su didesniu RA ligos aktyvumu, blogesniais fizinės sveikatos rodikliais. Didelis vitamino D trūkumas sergantiesiems RA neabejotinai turėtų būti

koreguojamas, o vitamino D papildų skyrimas galėtų tapti kompleksinio RA gydymo dalimi. Žinoma, kad lėtiniai infekcijos židiniai gali riboti RA sergančių pacientų gydymo galimybes ir bloginti ligos eigą. Nepaisant apskritai gana gero odontologinių paslaugų prieinamumo (deja, tai nevisada pasakytina apie ilgai lėtinėmis ligomis sergančiuosius), lėtinio periodontito paplitimas tirtoje RA sergančiųjų imtyje yra labai didelis. Šis tyrimas įrodė lėtinio PD sunkumo ir RA ligos aktyvumo sąsajas, taip pat kad nustatoma didesnė vitamino D koncentracija kraujo serume yra susijusi su geresnėmis PD išėjimais RA sergantiems pacientams.

Šio mokslinio tyrimo rezultatai papildė žinias apie poreikį informuoti sergančius reumatoidiniu artritu pacientus apie vitamino D naudą ne tik bendrai savijautai, kaulinio audinio apykaitai, bet ir RA ligos aktyvumui, fizinės sveikatos gerinimui bei periodontito kontrolei. Todėl, atsižvelgiant į vitamino D koncentraciją kraujo serume, turėtų būti rekomenduota naudoti vitamino D papildus. Kitas svarbus veiksnys – reguliarūs ir savalaikiai vizitai pas gydytoją odontologą, periodontologą dėl lėtinių infekcijos židinių, taip pat lėtinio periodontito ištyrimo ir gydymo siekiant moduluoti RA ligos aktyvumą.

Apibendrinant – vitamino D papildų skyrimas ir lėtinio periodontito gydymas yra saugūs, nebrangūs ir naudingi RA eigą modifikuojantys veiksniai.

8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Calabresi E, Petrelli F, Bonifacio AF, Puxeddu I, Alunno A. One year in review 2018: Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2018; 36:175–184.
2. van der Woude D, van der Helm-van Mil AHM. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2018 Apr;32(2):174–187. doi: 10.1016/j.berh.2018.10.005. Epub 2018 Nov 16. PMID: 30527425.
3. Otón T, Carmona L. The epidemiology of established rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2019 Oct;33(5):101477. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2019.101477> Epub 2020 Jan 25. PMID: 31987685.
4. Glant, TT, Mikecz K & Rauch TA. Epigenetics in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *BMC Med*. 2014; 12, 35. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-35>
5. Vojinovic J, Tincani A, Sulli A, Soldano S, Andreoli L, Dall'Ara F, Ionescu R, Pasalic KS, Balcune I, Ferraz-Amaro I, Tlustochowicz M, Butrimiene I, Punceviciene E, Toroptsova N, Grazio S, Morovic-Vergles J, Masaryk P, Otsa K, Bernardes M, Boyadzhieva V, Salaffi F, Cutolo M. European multicentre pilot survey to assess vitamin D status in rheumatoid arthritis patients and early development of a new Patient Reported Outcome questionnaire (D-PRO). *Autoimmun Rev*. 2017 May;16(5):548–554. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.03.002> Epub 2017 Mar 6. PMID: 28279841.
6. Lin J, Liu J, Davies ML, Chen W. Serum vitamin D level and rheumatoid arthritis disease activity: Review and meta-analysis. *PLoS One*. 2016 Jan 11;11(1):e0146351. doi: 10.1371/journal.pone.0146351. PMID: 26751969; PMCID: PMC4709104.
7. Welsh P, Peters MJ, McInnes IB, Lems WF, Lips PT, McKellar G, Knox S, Michael Wallace A, Dijkmans BA, Nurmohamed MT, Sattar N. Vitamin D deficiency is common in patients with RA and linked to disease activity, but circulating levels are unaffected by TNF α blockade: Results from a prospective cohort study. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jun;70(6):1165-7. doi: 10.1136/ard.2010.137265. Epub 2010 Nov 3. PMID: 21047908.

8. Charoenngam N, Holick MF. Immunologic effects of vitamin D on human health and disease. *Nutrients*. 2020; 12, 2097. <https://doi.org/10.3390/nu12072097>
9. Umar M, Sastry KS, Chouchane AI. Role of vitamin D beyond the skeletal function: A review of the molecular and clinical studies. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19, 1618. <https://doi.org/10.3390/ijms19061618>
10. Bragazzi NL, Watad A, Neumann SG, Simon M, Brown SB, Abu Much A, Harari A, Tiosano S, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and rheumatoid arthritis: An ongoing mystery. *Curr Opin Rheumatol*. 2017; Jul;29(4):378–388. doi: 10.1097/BOR.0000000000000397. PMID: 28463872.
11. Agmon-Levin N, Theodor E, Segal RM, Shoenfeld Y. Vitamin D in systemic and organ-specific autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013 Oct;45(2):256–66. doi: 10.1007/s12016-012-8342-y. PMID: 23238772.
12. Ranganathan P. Genetics of bone loss in rheumatoid arthritis-role of vitamin D receptor polymorphisms. *Rheumatology (Oxford)*. 2009 Apr;48(4):342–6. doi: 10.1093/rheumatology/ken473. Epub 2009 Jan 16. PMID: 19151030; PMCID: PMC2722799.
13. Song GG, Bae SC, Lee YH. Vitamin D receptor FokI, BsmI, and TaqI polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis : A meta-analysis. *Z Rheumatol*. 2016 Apr;75(3):322–9. doi: 10.1007/s00393-015-1581-6. PMID: 26358095.
14. Fetahu IS, Höbaus J, Kállay E. Vitamin D and the epigenome. *Front Physiol*. 2014 Apr 29;5:164. doi: 10.3389/fphys.2014.00164. PMID: 24808866; PMCID: PMC4010791.
15. Nakano K, Whitaker JW, Boyle DL, Wang W, Firestein GS. DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013 Jan;72(1):110–7. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201526.
16. Ogrendik M. Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease caused by periodontal pathogens. *Int J Gen Med*. 2013. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S45929>
17. Kobayashi T, Yoshie H. Host responses in the link between periodontitis and rheumatoid arthritis. *Curr Oral Health Rep*. 2015; 2: 1–8.
18. Marotte H, Farge P, Gaudin P, Alexandre C, Mougin B, Miossec P. The association between periodontal disease and joint destruction in rheumatoid arthritis extends the link between the HLA-DR shared epitope and severity of bone destruction. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:905–9.

19. Jagelavičienė E, Vaitkevičienė I, Šilingaitė D, Šinkūnaitė E, Daugėlaitė G. The relationship between vitamin D and periodontal pathology. *Medicina (Kaunas)*. 2018; 12;54(3):45. <https://doi.org/10.3390/medicina54030045>
20. de Smit M, Westra J, Vissink A, Doornbos-van der Meer B, Brouwer E, van Winkelhoff AJ. Periodontitis in established rheumatoid arthritis patients: A cross-sectional clinical, microbiological and serological study. *Arthritis Res Ther*. 2012. <https://doi.org/10.1186/ar4061>
21. Arkema EV, Karlson EW, Costenbader KH. A prospective study of periodontal disease and risk of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2010; 37(9):1800-1804. <https://doi.org/10.3899/jrheum.091398>
22. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017 Jun;18(2):153-165. doi: 10.1007/s11154-017-9424-1. PMID: 28516265.
23. Ishikawa LLW, Colavite PM, Fraga-Silva TFdC et al. Vitamin D deficiency and rheumatoid arthritis. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2017; 52, 373–388. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8577-0>
24. Textbook on Rheumatic Diseases/Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2001 Sep 15;358(9285):903-11. doi: 10.1016/S0140-6736(01)06075-5. PMID: 11567728.
25. Scherer HU, Häupl T, Burmester GR. The etiology of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 2020 Jun;110:102400. doi: 10.1016/j.jaut.2019.102400. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31980337.
26. Deane KD. Preclinical rheumatoid arthritis and rheumatoid arthritis prevention. *Curr Rheumatol Rep*. 2018; 20, 50. <https://doi.org/10.1007/s11926-018-0754-0>
27. van Steenberg HW, Huizinga TW & van der Helm-van Mil AH. The preclinical phase of rheumatoid arthritis: What is acknowledged and what needs to be assessed? *Arthritis Rheum*. 2013; 65, 2219–2232.
28. Deane KD, Demoruelle MK, Kelmenson LB, Kuhn KA, Norris JM, Holers VM. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017 Feb;31(1):3–18. doi: 10.1016/j.berh.2017.08.003. Epub 2017 Sep 18. PMID: 29221595; PMCID: PMC5726551.
29. Gioia C, Lucchino B, Tarsitano MG, Iannuccelli C, Di Franco M. Dietary habits and nutrition in rheumatoid arthritis: Can diet influence disease development and clinical manifestations? *Nutrients*. 2020 May 18;12(5):1456. doi: 10.3390/nu12051456. PMID: 32443535; PMCID: PMC7284442.

30. Pratesi F, Petit Teixeira E, Sidney J, Michou L, Puxeddu I, Sette A, Cornelis F, Migliorini P. HLA shared epitope and ACPA: Just a marker or an active player? *Autoimmun Rev.* 2013 Oct;12(12):1182–7. doi: 10.1016/j.autrev.2013.08.002. Epub 2013 Aug 16. PMID: 23958703.
31. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2011;365:2205–2219.
32. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* 2006;54:38–46.
33. Hussein HM, Rahal EA. The role of viral infections in the development of autoimmune diseases. *Crit Rev Microbiol.* 2019 Aug;45(4):394–412. doi: 10.1080/1040841X.2019.1614904.
34. Scher JU, Littman DR, Abramson SB. Microbiome in inflammatory arthritis and human rheumatic diseases. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Jan;68(1):35–45. doi: 10.1002/art.39259.
35. du Teil Espina M, Gabarrini G, Harmsen HJM, Westra J, van Winkelhoff AJ, van Dijk JM. Talk to your gut: The oral-gut microbiome axis and its immunomodulatory role in the etiology of rheumatoid arthritis. *FEMS Microbiol Rev.* 2019 Jan 1;43(1):1–18. doi: 10.1093/femsre/fuy035.
36. Jung ES, Choi YY, Lee KH. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease in Korean adults: Data from the Sixth Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 2013 to 2015. *J Periodontol.* 2019; 90(4):350–357. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0290>
37. Dissick A, Redman RS, Jones M, Rangan BV, Reimold A, Griffiths GR, Mikuls TR, Amdur RL, Richards JS, Kerr GS. Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: A pilot study. *J Periodontol.* 2010; 81(2):223–230. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090309>
38. Äyräväinen L, Leirisalo-Repo M, Kuuliala A, Ahola K, Koivuniemi R, Meurman JH, Heikkinen AM. Periodontitis in early and chronic rheumatoid arthritis: A prospective follow-up study in Finnish population. *BMJ Open.* 2017. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-011916>
39. Potempa J, Mydel P, Koziel J. The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2017; 13(10):606–620. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.132>

40. de Molon RS, Rossa C Jr, Thurlings RM, Cirelli JA, Koenders MI. Linkage of periodontitis and rheumatoid arthritis: Current evidence and potential biological interactions. *Int J Mol Sci.* 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20184541>
41. Konig MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, Rosen A, Nigrovic PA, Sokolove J, Giles JT, Moutsopoulos NM, Andrade F. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.* 2016. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaj1921>
42. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011 Feb;11(2):85–97. doi: 10.1038/nri2921.
43. Meena N, Singh Chawla SP, Garg R, Batta A, Kaur S. Assessment of Vitamin D in rheumatoid arthritis and its correlation with disease activity. *J Nat Sci Biol Med.* 2018 Jan-Jun;9(1):54–58. doi: 10.4103/jnsbm.JNSBM_128_17. PMID: 29456394; PMCID: PMC5812075.
44. Cutolo M, Sulli A, Paolino S, Pizzorni C. CTLA-4 blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: An update. *Expert Rev Clin Immunol.* 2016; 12(4):417–25. doi: 10.1586/1744666X.2016.1133295.
45. Middleton J, Americh L, Gayon R, Julien D, Aguilar L, Amalric F, Girard JP. Endothelial cell phenotypes in the rheumatoid synovium: Activated, angiogenic, apoptotic and leaky. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(2):60–72. doi: 10.1186/ar1156.
46. Elshabrawy HA, Chen Z, Volin MV, Ravella S, Virupannavar S, Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis.* 2015 Oct; 18(4):433–48. doi: 10.1007/s10456-015-9477-2.
47. Frisell T, Saevarsdottir S, Askling J. Family history of rheumatoid arthritis: An old concept with new developments *Nat Rev Rheumatol.* 2016; 12 (6), pp. 335–343
48. Messemaker TC, Huizinga TW, Kurreeman F. Immunogenetics of rheumatoid arthritis: Understanding functional implications. *J Autoimmun.* 2015 Nov;64:74–81. doi: 10.1016/j.jaut.2015.07.007. Epub 2015 Jul 26. PMID: 26215034.
49. Kaminsky ZA, Tang T, Wang SC, Ptak C, Oh GH, Wong AH, Feldcamp LA, Virtanen C, Halfvarson J, Tysk C, et al. DNA

- methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat. Genet.* 2009; 41, 240–245.
50. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987; 30(11): 1205–1213.
 51. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity.* 2017 Feb 21; 46(2):183–196. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.006. PMID: 28228278; PMCID: PMC5385708.
 52. Karami J, Aslani S, Jamshidi A, Garshasbi M, Mahmoudi M. Genetic implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis; an updated review. *Gene.* 2019 Jun 20; 702:8–16. doi: 10.1016/j.gene.2019.03.033. Epub 2019 Mar 20. PMID: 30904715.
 53. Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, Schreuder GM, Wener M, Breedveld FC, Ahmad N, Lum RF, de Vries RR, Gregersen PK, Toes RE, Criswell LA. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum.* 2005 Nov;52(11):3433–8. doi: 10.1002/art.21385. PMID: 16255021.
 54. Verpoort KN, van Gaalen FA, van der Helm-van Mil AH, Schreuder GM, Breedveld FC, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE. Association of HLA-DR3 with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005 Oct;52(10):3058–62. doi: 10.1002/art.21302. PMID: 16200610.
 55. Jutley G, Raza K, Buckley CD. New pathogenic insights into rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2015 May;27(3):249–55. doi: 10.1097/BOR.000000000000174. PMID: 25775189.
 56. Alvandpur N, Tabatabaei R, Tahamoli-Roudsari A, Basiri Z, Behzad M, Rezaeepoor M, Roshanaei G, Hajilooi M, Solgi G. Circulating IFN- γ producing CD4⁺ T cells and IL-17A producing CD4⁺ T cells, HLA-shared epitope and ACPA may characterize the clinical response to therapy in rheumatoid arthritis patients. *Hum Immunol.* 2020 May;81(5):228–236. doi: 10.1016/j.humimm.2020.02.008. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32107036.
 57. Choy E. Understanding the dynamics: Pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2012 Jul;51 Suppl 5:v3–11. doi: 10.1093/rheumatology/kes113. PMID: 22718924.

58. Okada Y, Wu D, Trynka G et al Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 2014;506:376–81. doi:10.1038/nature12873
59. Okada Y, Eyre S, Suzuki A, Kochi Y, Yamamoto K. Genetics of rheumatoid arthritis: 2018 status. *Ann Rheum Dis.* 2019 Apr;78(4):446–453. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-213678. Epub 2018 Dec 8. PMID: 30530827.
60. Plant D, Flynn E, Mbarek H, Dieudé P, Cornelis F, Ärlestig L et al. Investigation of potential non-HLA rheumatoid arthritis susceptibility loci in a European cohort increases the evidence for nine markers *Ann Rheum Dis.* 2010; 69:1548–1553.
61. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between TNFAIP3 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Inflamm Res*, 2012; 61:635–641.
62. Liang YL, Wu H, Shen X, Li PQ, Yang XQ, Liang L et al. Association of STAT4 rs7574865 polymorphism with autoimmune diseases: A meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012; 39:8873–8882.
63. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and rheumatoid arthritis: A meta-analysis update. *Rheumatol Int.* 2013; (33):1991–1999. <https://doi.org/10.1007/s00296-013-2679-2>
64. Hou S, Gao GP, Zhang XJ, Sun L, Peng WJ, Wang HF, Ge XJ, Huang W, Sun YH. PADI4 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Mod Rheumatol.* 2013 Jan;23(1):50–60. doi: 10.1007/s10165-012-0639-4. Epub 2012 May 3. Erratum in: *Mod Rheumatol.* 2013 Jan;23(1):61. PMID: 22552437.
65. Song GG, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Lee YH. Associations between interleukin-23 receptor polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012; 39:10655–10663
66. Chatzikyriakidou A, Voulgari PV, Lambropoulos A, Drosos AA. Genetics in rheumatoid arthritis beyond HLA genes: What meta-analyses have shown? *Semin Arthritis Rheum.* 2013 Aug;43(1):29–38. doi: 10.1016/j.semarthrit.2012.12.003.
67. Diaz-Gallo LM, Ramsköld D, Shchetynsky K, Folkersen L, Chemin K, Brynedal B, Uebe S, Okada Y, Alfredsson L, Klareskog L, Padyukov L. Systematic approach demonstrates enrichment of multiple interactions between non-HLA risk variants and HLA-DRB1 risk alleles in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2018

- Oct;77(10):1454–1462. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213412>
68. Zhang L, Lu Q, Chang C. Epigenetics in health and disease. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1253:3–55. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3449-2_1.
 69. Zhang Y, Sun Z, Jia J, Du T, Zhang N, Tang Y, Fang Y, Fang D. Overview of histone modification. *Adv Exp Med Biol.* 2021;1283:1–16. doi: 10.1007/978-981-15-8104-5_1.
 70. Feng L, Lou J. DNA methylation analysis. *Methods Mol Biol.* 2019;1894:181–227. doi: 10.1007/978-1-4939-8916-4_12. PMID: 30547463.
 71. Chen L, Heikkinen L, Wang C, Yang Y, Sun H, Wong G. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. *Brief Bioinform.* 2019 Sep 27;20(5):1836–1852. doi: 10.1093/bib/bby054. PMID: 29982332; PMCID: PMC7414524.
 72. Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature.* 2019 Jul;571(7766):489–499. doi: 10.1038/s41586-019-1411-0.
 73. Surace AEA, Hedrich CM. The role of epigenetics in autoimmune/inflammatory disease. *Front Immunol.* 2019 Jul 4;10:1525. doi: 10.3389/fimmu.2019.01525. PMID: 31333659; PMCID: PMC6620790.
 74. Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet.* 2016 Aug;17(8):487–500. doi: 10.1038/nrg.2016.59. Epub 2016 Jun 27. PMID: 27346641.
 75. Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. *Sci Adv.* 2016 Jul 29;2(7):e1600584. doi: 10.1126/sciadv.1600584.
 76. Tiffon C. The Impact of nutrition and environmental epigenetics on human health and disease. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 1;19(11):3425. doi: 10.3390/ijms19113425.
 77. Lee GR, Kim ST, Spilianakis CG, Fields PE, Flavell RA. T helper cell differentiation: Regulation by cis elements and epigenetics. *Immunity.* 2006 Apr; 24(4):369–79. doi: 10.1016/j.immuni.2006.03.007.
 78. Bao Y, Cao X. Epigenetic control of B cell development and B-cell-related immune disorders. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016 Jun;50(3):301–11. doi: 10.1007/s12016-015-8494-7.
 79. Ciechomska Marzena, Roszkowski Leszek, Maslinski Wlodzimierz. DNA methylation as a future therapeutic and diagnostic target in rheumatoid arthritis. *Cells.* 2019; 8,9: 953.

80. Hellman A, Chess A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science*. 2007 Feb 23;315(5815):1141–3. doi: 10.1126/science.1136352.
81. Aslani S, Mahmoudi M, Karami J, Jamshidi AR, Malekshahi Z, Nicknam MH. Epigenetic alterations underlying autoimmune diseases. *Autoimmunity* 2016; 49: 69–83.
82. Lyko F. The DNA methyltransferase family: A versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet*. 2018 Feb;19(2):81–92. doi: 10.1038/nrg.2017.80.
83. Trenkmann M, Brock M, Ospelt C, Gay S. Epigenetics in rheumatoid arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010 Aug;39(1):10–9. doi: 10.1007/s12016-009-8166-6. PMID: 19707891.
84. Cui X, Jing X, Wu X, Yan M, Li Q, Shen Y, Wang Z. DNA methylation in spermatogenesis and male infertility. *Exp Ther Med*. 2016 Oct;12(4):1973–1979. doi: 10.3892/etm.2016.3569.
85. Glossop JR, Emes RD, Nixon NB, Packham JC, Fryer AA, Matthey DL, Farrell WE. Genome-wide profiling in treatment-naive early rheumatoid arthritis reveals DNA methylome changes in T and B lymphocytes. *Epigenomics*. 2016; 8(2):209–224.
86. Vecellio M, Wu H, Lu Q, Selmi C. The multifaceted functional role of DNA methylation in immune-mediated rheumatic diseases. *Clin Rheumatol*. 2021 Feb; 40(2):459–476. doi: 10.1007/s10067-020-05255-5.
87. Corvetta A, Della Bitta R, Luchetti M M, Pomponio G. 5-Methylcytosine content of DNA in blood, synovial mononuclear cells and synovial tissue from patients affected by autoimmune rheumatic diseases. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1991; 566(2), 481–491.
88. Kim YI, Logan JW, Mason JB, Roubenoff R. DNA hypomethylation in inflammatory arthritis: Reversal with methotrexate. *J Lab Clin Med*. 1996 Aug;128(2):165–72. doi: 10.1016/s0022-2143(96)90008-6. PMID: 8765212.
89. Liu CC, Fang TJ, Ou TT, Wu CC, Li RN, Lin YC, Lin CH, Tsai WC, Liu HW, Yen JH. Global DNA methylation, DNMT1, and MBD2 in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett*. 2011 Mar 30;135(1-2):96–9. doi: 10.1016/j.imlet.2010.10.003.
90. Liu Y, Aryee MJ, Padyukov L, Fallin MD, Hesselberg E, Runarsson A, Reinius L, Acevedo N, Taub M, Ronninger M, Shchetynsky K, Scheynius A, Kere J, Alfredsson L, Klareskog L, Ekström TJ, Feinberg AP. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as

- an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat Biotechnol.* 2013; 31(2):142–147.
91. Ishida Kohei et al. Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *Journal of Periodontology.* 2012; 83.7: 917–925.
 92. Hirano T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: A personal memoir. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010;86(7):717–30. doi: 10.2183/pjab.86.717.
 93. Mok A, Rhead B, Hologue C, Shao X, Quach HL, Quach D, Sinclair E, Graf J, Imboden J, Link T, Harrison R, Chernitskiy V, Barcellos LF, Criswell LA. Hypomethylation of CYP2E1 and DUSP22 promoters associated with disease activity and erosive disease among rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheumatol.* 2018 Apr; 70(4):528–536. doi: 10.1002/art.40408.
 94. Karami J, Aslani S, Tahmasebi MN, Mousavi MJ, Sharafat Vaziri A, Jamshidi A, Farhadi E, Mahmoudi M. Epigenetics in rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes as an emerging paradigm in the pathogenesis of the disease. *Immunol Cell Biol.* 2020 Mar; 98(3):171–186. doi: 10.1111/imcb.12311.
 95. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: Key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010; 233: 233–255.
 96. Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2009 Dec;60(12):3613–22. doi: 10.1002/art.25018.
 97. Cribbs A, Feldmann M, Oppermann U. Towards an understanding of the role of DNA methylation in rheumatoid arthritis: Therapeutic and diagnostic implications. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2015 Oct;7(5):206–19. doi: 10.1177/1759720X15598307.
 98. Takami N, Osawa K, Miura Y, et al. Hypermethylated promoter region of DR3, the death receptor 3 gene, in rheumatoid arthritis synovial cells. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 779–787.
 99. Karouzakis E, Rengel Y, Jünger A, Kolling C, Gay RE, Michel BA, Tak PP, Gay S, Neidhart M, Ospelt C. DNA methylation regulates the expression of CXCL12 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Genes Immun.* 2011 Dec;12(8):643–52. doi: 10.1038/gene.2011.45.
 100. Zhu H, Wu LF, Mo XB, Lu X, Tang H, Zhu XW, Xia W, Guo YF, Wang MJ, Zeng KQ, Wu J, Qiu YH, Lin X, Zhang YH, Liu YZ, Yi NJ, Deng FY, Lei SF. Rheumatoid arthritis-associated DNA methylation sites in peripheral blood mononuclear cells. *Ann Rheum Dis.* 2019 Jan;78(1):36–42. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-213970

101. Julià A, Absher D, López-Lasanta M, Palau N, Pluma A, Waite Jones L, Glossop JR, Farrell WE, Myers RM, Marsal S. Epigenome-wide association study of rheumatoid arthritis identifies differentially methylated loci in B cells. *Hum Mol Genet.* 2017 Jul 15;26(14):2803–2811. doi: 10.1093/hmg/ddx177.
102. Klein K, Gay S. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis, a review. *Curr Opin Pharmacol.* 2013 Jun;13(3):420–5. doi: 10.1016/j.coph.2013.01.007.
103. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007 Jul 19;357(3):266–81. doi: 10.1056/NEJMra070553. PMID: 17634462.
104. Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010 Jun;39(2):243–53, table of contents. doi: 10.1016/j.ecl.2010.02.002.
105. Aranow C. Vitamin D and the immune system. *J Investig Med.* 2011 Aug;59(6):881–6. doi: 10.2310/JIM.0b013e31821b8755. PMID: 21527855; PMCID: PMC3166406.
106. Deluca HF. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey Rep.* 2014 Jan 8;3:479. doi: 10.1038/bonekey.2013.213.
107. Illescas-Montes R, Melguizo-Rodríguez L, Ruiz C, Costela-Ruiz VJ. Vitamin D and autoimmune diseases. *Life Sci.* 2019 Sep 15;233:116744. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116744.
108. Dereje S, Muradov I, Nazzal S, Nguyen T. Cholecalciferol (D3) versus ergocalciferol (D2) in older adults. *Consult Pharm.* 2017 Jun 1;32(6):337–339. doi: 10.4140/TCP.n.2017.337.
109. Zhu JG, Ochalek JT, Kaufmann M, Jones G, Deluca HF. CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Sep 24;110(39):15650–5. doi: 10.1073/pnas.1315006110.
110. Adams JS, Hewison M. Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase. *Arch Biochem Biophys.* 2012 Jul 1;523(1):95–102. doi: 10.1016/j.abb.2012.02.016.
111. Hewison M, Freeman L, Hughes SV, Evans KN, Bland R, Eliopoulos AG, Kilby MD, Moss PA, Chakraverty R. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2003 Jun 1;170(11):5382–90. doi: 10.4049/jimmunol.170.11.5382.
112. Hewison M. Vitamin D and the intracrinology of innate immunity. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Jun 10;321(2):103–11. doi: 10.1016/j.mce.2010.02.013.

113. P. Borel, D. Caillaud, N.J. Cano. Vitamin D bioavailability: State of the art. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2015; 55:1193–1205. doi:10.1080/10408398.2012.688897
114. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): Its important role in the degradation of vitamin D. *Arch Biochem Biophys.* 2012 Jul 1;523(1):9–18. doi: 10.1016/j.abb.2011.11.003.
115. Francis RM, Aspray TJ, Bowring CE, Fraser WD, Gittoes NJ, Javaid MK, Macdonald HM, Patel S, Selby PL, Tanna N. National Osteoporosis Society practical clinical guideline on vitamin D and bone health. *Maturitas.* 2015 Feb;80(2):119–21. doi: 10.1016/j.maturitas.2014.11.018.
116. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM, Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96:1911–1930. doi:10.1210/jc.2011-0385.
117. Hewison M. Vitamin D and innate and adaptive immunity. *Vitam Horm.* 2011;86:23–62. doi: 10.1016/B978-0-12-386960-9.00002-2. PMID: 21419266.
118. Margolis RN, Christakos S. The nuclear receptor superfamily of steroid hormones and vitamin D gene regulation. An update. *Ann NY Acad Sci.* 2010; 1192: 208–214.
119. Kongsbak M, Levring TB, Geisler C, von Essen MR. The vitamin d receptor and T cell function. *Front Immunol.* 2013 Jun 18;4:148. doi: 10.3389/fimmu.2013.00148.
120. Aslam MM, John P, Bhatti A, Jahangir S, Kamboh MI. Vitamin D as a principal factor in mediating rheumatoid arthritis-derived immune response. *Biomed Res Int.* 2019 May 7;2019:3494937. doi: 10.1155/2019/3494937.
121. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys.* 2012 Jul 1;523(1):123–33. doi: 10.1016/j.abb.2012.04.001.
122. Harrison SR, Li D, Jeffery LE, Raza K, Hewison M. Vitamin D, autoimmune disease and rheumatoid arthritis. *Calcif Tissue Int.* 2020 Jan;106(1):58–75. doi: 10.1007/s00223-019-00577-2.
123. Manolagas SC, Werntz DA, Tsoukas CD, Provvedini DM, Vaughan JH. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptors in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Lab Clin Med.* 1986 Dec;108(6):596–600.

124. Jeffery LE, Raza K, Hewison M. Vitamin D in rheumatoid arthritis-towards clinical application. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Apr;12(4):201–10. doi: 10.1038/nrrheum.2015.140.
125. Barragan M, Good M, Kolls JK. Regulation of dendritic cell function by vitamin D. *Nutrients*. 2015 Sep 21;7(9):8127–51. doi: 10.3390/nu7095383.
126. Vanherwegen AS, Gysemans C, Mathieu C. Regulation of immune function by vitamin D and its use in diseases of immunity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2017 Dec;46(4):1061–1094. doi: 10.1016/j.ecl.2017.07.010.
127. Joshi S, Pantalena LC, Liu XK, Gaffen SL, Liu H, Rohowsky-Kochan C, Ichiyama K, Yoshimura A, Steinman L, Christakos S, Youssef S. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol*. 2011 Sep;31(17):3653–69. doi: 10.1128/MCB.05020-11.
128. Cantorna MT, Snyder L, Lin YD, Yang L. Vitamin D and 1,25(OH)₂D regulation of T cells. *Nutrients*. 2015 Apr 22;7(4):3011–21. doi: 10.3390/nu7043011.
129. Yasuda K, Takeuchi Y, Hirota K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Semin Immunopathol*. 2019 May;41(3):283–297. doi: 10.1007/s00281-019-00733-8.
130. Jeffery LE, Henley P, Marium N, Filer A, Sansom DM, Hewison M, Raza K. Decreased sensitivity to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in T cells from the rheumatoid joint. *J Autoimmun*. 2018 Mar;88:50–60. doi: 10.1016/j.jaut.2017.10.001.
131. Laragione T, Shah A, Gulko PS. The vitamin D receptor regulates rheumatoid arthritis synovial fibroblast invasion and morphology. *Mol Med*. 2012 Mar 27;18(1):194–200. doi: 10.2119/molmed.2011.00410.
132. Feng X, Lv C, Wang F, Gan K, Zhang M, Tan W. Modulatory effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on IL1 β -induced RANKL, OPG, TNF α , and IL-6 expression in human rheumatoid synoviocyte MH7A. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:160123. doi: 10.1155/2013/160123.
133. Gu X, Gu B, Lv X, Yu Z, Wang R, Zhou X, Qiao W, Mao Z, Zuo G, Li Q, Miao D, Jin J. 1, 25-dihydroxy-vitamin D₃ with tumor necrosis factor-alpha protects against rheumatoid arthritis by promoting p53 acetylation-mediated apoptosis via Sirt1 in synoviocytes. *Cell Death Dis*. 2016 Oct 20;7(10):e2423. doi: 10.1038/cddis.2016.300.
134. Haroon M, Bond U, Quillinan N, Phelan MJ, Regan MJ. The prevalence of vitamin D deficiency in consecutive new patients seen

- over a 6-month period in general rheumatology clinics. *Clin Rheumatol.* 2011 Jun;30(6):789–94. doi: 10.1007/s10067-010-1659-0.
135. Zheng ZH, Gao CC, Wu ZZ, Liu SY, Li TF, Gao GM et al. High prevalence of hypovitaminosis D of patients with autoimmune rheumatic diseases in China.
 136. Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG; Iowa Women's Health Study. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum.* 2004 Jan;50(1):72–7. doi: 10.1002/art.11434.
 137. Song GG, Bae SC, Lee YH. Association between vitamin D intake and the risk of rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Clin Rheumatol.* 2012;31:1733–1739.
 138. Costenbader KH, Feskanich D, Holmes M, Karlson EW, Benito-Garcia E. Vitamin D intake and risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in women.
 139. Nielen MM, van Schaaredenburg D, Lems WF, van Stadt RJ, de Koning M, Reesink HW, Habibuw MR. Vitamin D deficiency does not increase the risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:3719–20.
 140. Lee TH, Jin WS, Park J, Choi HH, Bae EJ. Vitamin D status and its associations with rheumatoid arthritis in Korean women: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2008-2014. *J Exerc Rehabil.* 2016 Dec 31;12(6):610–617. doi: 10.12965/jer.1632870.435.
 141. Feser M, Derber LA, Deane KD, Lezotte DC, Weisman MH, Buckner JH, Mikuls T, O'Dell J, Gregersen PK, Holers VM, Norris JM. Plasma 25,OH vitamin D concentrations are not associated with rheumatoid arthritis (RA)-related autoantibodies in individuals at elevated risk for RA. *J Rheumatol.* 2009 May;36(5):943–6. doi: 10.3899/jrheum.080764.
 142. Di Franco M, Barchetta I, Iannuccelli C, Gerardi MC, Frisenda S, Ceccarelli F, Valesini G, Cavallo MG. Hypovitaminosis D in recent onset rheumatoid arthritis is predictive of reduced response to treatment and increased disease activity: A 12 month follow-up study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2015 Mar 15;16:53. doi: 10.1186/s12891-015-0505-6.
 143. Haga HJ, Schmedes A, Naderi Y, Moreno AM, Peen E. Severe deficiency of 25-hydroxyvitamin D3 (25-OH-D3) is associated with

- high disease activity of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2013 May;32(5):629–33. doi: 10.1007/s10067-012-2154-6
144. Furuya T, Hosoi T, Tanaka E, Nakajima A, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H. Prevalence of and factors associated with vitamin D deficiency in 4,793 Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2013 Jul;32(7):1081–7. doi: 10.1007/s10067-013-2216-4.
 145. Hong Q, Xu J, Xu S, Lian L, Zhang M, Ding C. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D and disease activity, inflammatory cytokines and bone loss in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Nov;53(11):1994–2001. doi: 10.1093/rheumatology/keu173.
 146. Theodoratou E, Tzoulaki I, Zgaga L, Ioannidis JP. Vitamin D and multiple health outcomes: Umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies and randomised trials. *BMJ*. 2014 Apr 1;348:g2035. doi: 10.1136/bmj.g2035.
 147. Matsumoto Y, Sugioka Y, Tada M, Okano T, Mamoto K, Inui K et al. Relationships between serum 25-hydroxycalciferol, vitamin D intake and disease activity in patients with rheumatoid arthritis--TOMORROW study. *Mod Rheumatol* 2015;25(2):246–50.
 148. Baker JF, Baker DG, Toedter G, Shults J, Von Feldt JM, Leonard MB. Associations between vitamin D, disease activity, and clinical response to therapy in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30(5):658–64.
 149. Raczkiwicz A, Kisiel B, Kulig M, Thustochowicz W. Vitamin D status and its association with quality of life, physical activity, and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *J Clin Rheumatol* 2015;21(3):126–30.
 150. de la Torre Lossa P, Moreno Álvarez M, González Guzmán MDC, López Martínez R, Ríos Acosta C. Vitamin D is not useful as a biomarker for disease activity in rheumatoid arthritis. *Reumatol Clin (Engl Ed)*. 2020 Mar-Apr;16(2 Pt 1):110–115. English, Spanish. doi: 10.1016/j.reuma.2018.02.016.
 151. Heidari B, Hajian-Tilaki K, Babaei M. Vitamin D deficiency and rheumatoid arthritis: Epidemiological, immunological, clinical and therapeutic aspects. *Mediterr J Rheumatol*. 2019 Jun 29;30(2):94–102. doi: 10.31138/mjr.30.2.94.
 152. Waldron JL, Ashby HL, Cornes MP, Bechervaise J, Razavi C, Thomas OL, Chugh S, Deshpande S, Ford C, Gama R. Vitamin D: A

- negative acute phase reactant. *J Clin Pathol*. 2013 Jul;66(7):620–2. doi: 10.1136/jclinpath-2012-201301.
153. Heidari B. Rheumatoid Arthritis: Early diagnosis and treatment outcomes. *Caspian J Intern Med*. 2011 Winter;2(1):161–70.
 154. McWilliams DF, Walsh DA. Pain mechanisms in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2017 Sep-Oct;35 Suppl 107(5):94–101
 155. Heidari B, Heidari P, Tilaki KH. Relationship between unexplained arthralgia and vitamin D deficiency: A case control study. *Acta Med Iran*. 2014;52(5):400–5.
 156. Heidari B, Javadian Y, Babaei M, Yousef-Ghahari B. Restorative effect of vitamin D deficiency on knee pain and quadriceps muscle strength in knee osteoarthritis. *Acta Med Iran*. 2015 Aug;53(8):466–70.
 157. Buondonno I, Rovera G, Sassi F, Rigoni MM, Lomater C, Parisi S, Pellerito R, Isaia GC, D'Amelio P. Vitamin D and immunomodulation in early rheumatoid arthritis: A randomized double-blind placebo-controlled study. *PLoS One*. 2017 Jun 5;12(6):e0178463. doi: 10.1371/journal.pone.0178463.
 158. Salesi M, Farajzadegan Z. Efficacy of vitamin D in patients with active rheumatoid arthritis receiving methotrexate therapy. *Rheumatol Int* 2012;32(7):2129–33.
 159. Chandrashekara S, Patted A. Role of vitamin D supplementation in improving disease activity in rheumatoid arthritis: An exploratory study. *Int J Rheum Dis* 2017;20(7):825–31
 160. Lourdudoss C, Wolk A, Nise L, Alfredsson L, Vollenhoven RV. Are dietary vitamin D, omega-3 fatty acids and folate associated with treatment results in patients with early rheumatoid arthritis? Data from a Swedish population-based prospective study. *BMJ Open*. 2017 Jun 10;7(6):e016154. doi: 10.1136/bmjopen-2017-016154.
 161. Gardner DH, Jeffery LE, Soskic B, Briggs Z, Hou TZ, Raza K, Sansom DM. 1,25(OH)₂D₃ promotes the efficacy of CD28 costimulation blockade by abatacept. *J Immunol*. 2015 Sep 15;195(6):2657–65. doi: 10.4049/jimmunol.1500306.
 162. Barry EL, Rees JR, Peacock JL, Mott LA, Amos CI, Bostick RM, Figueiredo JC, Ahnen DJ, Bresalier RS, Burke CA, Baron JA. Genetic variants in CYP2R1, CYP24A1, and VDR modify the efficacy of vitamin D₃ supplementation for increasing serum 25-hydroxyvitamin D levels in a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Oct;99(10):E2133–7. doi: 10.1210/jc.2014-1389.

163. Saccone D, Asani F, Bornman L. Regulation of the vitamin D receptor gene by environment, genetics and epigenetics. *Gene*. 2015 May 1;561(2):171–80. doi: 10.1016/j.gene.2015.02.024.
164. Ruiz-Ballesteros AI, Meza-Meza MR, Vizmanos-Lamotte B, Parra-Rojas I, de la Cruz-Mosso U. Association of vitamin D metabolism gene polymorphisms with autoimmunity: Evidence in population genetic studies. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 17;21(24):9626. doi: 10.3390/ijms21249626.
165. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen H, Pols HA. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May;89–90(1–5):187–93. doi: 10.1016/j.jsbmb.2004.03.083.
166. Sepulveda-Villegas M, Elizondo-Montemayor L, Trevino V. Identification and analysis of 35 genes associated with vitamin D deficiency: A systematic review to identify genetic variants. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2020 Feb;196:105516. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105516.
167. Taylor JG, Choi EH, Foster CB, Chanock SJ. Using genetic variation to study human disease. *Trends Mol Med*. 2001 Nov;7(11):507–12. doi: 10.1016/s1471-4914(01)02183-9.
168. Guo Y, Jamison DC. The distribution of SNPs in human gene regulatory regions. *BMC Genomics*. 2005 Oct 6;6:140. doi: 10.1186/1471-2164-6-140.
169. Hoogendoorn B, Coleman SL, Guy CA, Smith K, Bowen T, Buckland PR, O'Donovan MC. Functional analysis of human promoter polymorphisms. *Hum Mol Genet*. 2003 Sep 15;12(18):2249–54. doi: 10.1093/hmg/ddg246.
170. Baranzini SE. The genetics of autoimmune diseases: A networked perspective. *Curr Opin Immunol*. 2009 Dec;21(6):596V605. doi: 10.1016/j.coi.2009.09.014.
171. Rukin NJ, Strange RC. What are the frequency, distribution, and functional effects of vitamin D receptor polymorphisms as related to cancer risk? *Nutr Rev*. 2007 Aug;65(8 Pt 2):S96–101. doi: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00350.x.
172. Berlanga-Taylor AJ, Knight JC. An integrated approach to defining genetic and environmental determinants for major clinical outcomes involving vitamin D. *Mol Diagn Ther*. 2014 Jun;18(3):261–72. doi: 10.1007/s40291-014-0087-2.

173. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004 Sep 1;338(2):143–56. doi: 10.1016/j.gene.2004.05.014.
174. Abouzid M, Karazniewicz-Lada M, Glowka F. Genetic determinants of vitamin D-related disorders; focus on vitamin D receptor. *Curr Drug Metab*. 2018;19(12):1042–1052. doi: 10.2174/1389200219666180723143552.
175. Zhai N, Bidares R, Makoui MH, Aslani S, Mohammadi P, Razi B, Imani D, Yazdchi M, Mikaeili H. Vitamin D receptor gene polymorphisms and the risk of the type 1 diabetes: a meta-regression and updated meta-analysis. *BMC Endocr Disord*. 2020 Aug 8;20(1):121. doi: 10.1186/s12902-020-00575-8.
176. Makoui MH, Imani D, Motallebnezhad M, Azimi M, Razi B. Vitamin D receptor gene polymorphism and susceptibility to asthma: Meta-analysis based on 17 case-control studies. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2020 Jan;124(1):57–69. doi: 10.1016/j.anai.2019.10.014
177. Cocco E, Meloni A, Murru MR, Corongiu D, Tranquilli S, Fadda E, Murru R, Schirru L, Secci MA, Costa G, Asunis I, Cuccu S, Fenu G, Loreface L, Carboni N, Mura G, Rosatelli MC, Marrosu MG. Vitamin D responsive elements within the HLA-DRB1 promoter region in Sardinian multiple sclerosis associated alleles. *PLoS One*. 2012;7(7):e41678. doi: 10.1371/journal.pone.0041678.
178. Zhang WT, Jin TF, Chen L. Associations of four common VDR polymorphisms with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: Evidence from a meta-analysis. *Lupus*. 2020 Apr;29(4):364–370. doi: 10.1177/0961203320909432.
179. Bagheri-Hosseiniabadi Z, Imani D, Yousefi H, Abbasifard M. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism and risk of rheumatoid arthritis (RA): Systematic review and meta-analysis. *Clin Rheumatol*. 2020 Dec;39(12):3555-3569. doi: 10.1007/s10067-020-05143-y.
180. Tizaoui K, Hamzaoui K. Association between VDR polymorphisms and rheumatoid arthritis disease: Systematic review and updated meta-analysis of case-control studies. *Immunobiology*. 2015 Jun;220(6):807–16. doi: 10.1016/j.imbio.2014.12.013.
181. Lee YH, Bae SC, Choi SJ et al. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2011; 38:3643–3651. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0477-4>
182. Gómez-Vaquero C, Fiter J, Enjuanes A, Nogués X, Díez-Pérez A, Nolla JM. Influence of the BsmI polymorphism of the vitamin D

- receptor gene on rheumatoid arthritis clinical activity. *J Rheumatol*. 2007 Sep;34(9):1823–6.
183. Mosaad YM, Hammad EM, Fawzy Z, Abdal Aal IA, Youssef HM, ElSaid TO, Monir R, El-Deek BS. Vitamin D receptor gene polymorphism as possible risk factor in rheumatoid arthritis and rheumatoid related osteoporosis. *Hum Immunol*. 2014 May;75(5):452–61. doi: 10.1016/j.humimm.2014.02.009.
 184. Di Spigna G, Del Puente A, Covelli B, Abete E, Varriale E, Salzano S, Postiglione L. Vitamin D receptor polymorphisms as tool for early screening of severe bone loss in women patients with rheumatoid arthritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016 Nov;20(22):4664–4669.
 185. O'Neill V, Asani FF, Jeffery TJ, Saccone DS, Bornman L. Vitamin D receptor gene expression and function in a South African population: Ethnicity, vitamin D and FokI. *PLoS One*. 2013 Jun 21;8(6):e67663. doi: 10.1371/journal.pone.0067663. PMID: 23805323.
 186. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiol Rev*. 2016 Jan; 96(1):365–408. doi: 10.1152/physrev.00014.2015.
 187. Carlberg C. Molecular endocrinology of vitamin D on the epigenome level. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Sep 15;453:14–21. doi: 10.1016/j.mce.2017.03.016.
 188. Herdick M, Carlberg C. Agonist-triggered modulation of the activated and silent state of the vitamin D(3) receptor by interaction with co-repressors and co-activators. *J Mol Biol*. 2000 Dec 15;304(5):793–801. doi: 10.1006/jmbi.2000.4267.
 189. Polly P, Herdick M, Moehren U, Baniahmad A, Heinzl T, Carlberg C. VDR-Alien: A novel, DNA-selective vitamin D(3) receptor-corepressor partnership. *FASEB J*. 2000 Jul;14(10):1455–63. doi: 10.1096/fj.14.10.1455.
 190. Pereira F, Barbáchano A, Silva J, Bonilla F, Campbell MJ, Muñoz A, Larriba MJ. KDM6B/JMJD3 histone demethylase is induced by vitamin D and modulates its effects in colon cancer cells. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec 1;20(23):4655–65. doi: 10.1093/hmg/ddr399.
 191. Nurminen V, Neme A, Seuter S, Carlberg C. The impact of the vitamin D-modulated epigenome on VDR target gene regulation. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 2018 Aug;1861(8):697–705. doi: 10.1016/j.bbagr.2018.05.006.
 192. Doig CL, Singh PK, Dhiman VK, Thorne JL, Battaglia S, Sobolewski M, Maguire O, O'Neill LP, Turner BM, McCabe CJ, Smiraglia DJ,

- Campbell MJ. Recruitment of NCOR1 to VDR target genes is enhanced in prostate cancer cells and associates with altered DNA methylation patterns. *Carcinogenesis*. 2013 Feb;34(2):248–56. doi: 10.1093/carcin/bgs331.
193. Zhou R, Chun RF, Lisse TS, Garcia AJ, Xu J, Adams JS, Hewison M. Vitamin D and alternative splicing of RNA. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015 Apr; 148:310-7. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.09.025.
 194. Singh PK, Doig CL, Dhiman VK, Turner BM, Smiraglia DJ, Campbell MJ. Epigenetic distortion to VDR transcriptional regulation in prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013 Jul;136:258–63. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.10.002.
 195. Höbaus J, Fetahu ISh, Khorchide M, Manhardt T, Kallay E. Epigenetic regulation of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase (CYP24A1) in colon cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013 Jul;136:296–9. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.08.003.
 196. Chan VS. Epigenetics in Multiple Sclerosis. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1253:309–374. doi: 10.1007/978-981-15-3449-2_12.
 197. Wang M, Kong W, He B, Li Z, Song H, Shi P, Wang J. Vitamin D and the promoter methylation of its metabolic pathway genes in association with the risk and prognosis of tuberculosis. *Clin Epigenetics*. 2018 Sep 12;10(1):118. doi: 10.1186/s13148-018-0552-6.
 198. Halsall JA, Osborne JE, Hutchinson PE, Pringle JH. In silico analysis of the 5' region of the Vitamin D receptor gene: Functional implications of evolutionary conservation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 Mar;103(3-5):352–6. doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.12.046.
 199. Bahrami A, Sadeghnia HR, Tabatabaeizadeh SA, Bahrami-Taghanaki H, Behboodi N, Esmaeili H, Ferns GA, Mobarhan MG, Avan A. Genetic and epigenetic factors influencing vitamin D status. *J Cell Physiol*. 2018 May;233(5):4033–4043. doi: 10.1002/jcp.26216.
 200. Beckett E L, Duesing K, Martin C, Jones P, Furst J, King K, Lucock M. Relationship between methylation status of vitamin D-related genes, vitamin D levels, and methyl-donor biochemistry. *J Nutr Intermed Metab*. 2016 (6): 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jnim.2016.04.010>
 201. Wjst M, Heimbeck I, Kutschke D, Pukelsheim K. Epigenetic regulation of vitamin D converting enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010 Jul;121(1-2):80–3. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.03.056.
 202. Novakovic B, Sibson M, Ng HK, Manuelpillai U, Rakyan V, Down T, Beck S, Fournier T, Evain-Brion D, Dimitriadis E, Craig JM,

- Morley R, Saffery R. Placenta-specific methylation of the vitamin D 24-hydroxylase gene: Implications for feedback autoregulation of active vitamin D levels at the fetomaternal interface. *J Biol Chem*. 2009 May 29;284(22):14838–48. doi: 10.1074/jbc.M809542200.
203. Zhu H, Wang X, Shi H, Su S, Harshfield GA, Gutin B, Snieder H, Dong Y. A genome-wide methylation study of severe vitamin D deficiency in African American adolescents. *J Pediatr*. 2013 May;162(5):1004–9.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.10.059.
204. Zhou Y, Zhao LJ, Xu X, Ye A, Travers-Gustafson D, Zhou B, Wang HW, Zhang W, Lee Hamm L, Deng HW, Recker RR, Lappe JM. DNA methylation levels of CYP2R1 and CYP24A1 predict vitamin D response variation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014 Oct;144 Pt A:207–14. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.10.004.
205. Chen L, Dong Y, Chen J, Huang Y, Zhu H. Epigenetics predicts serum 25-Hydroxyvitamin D response to vitamin D3 supplementation in African Americans. *Mol Nutr Food Res*. 2020 Jan;64(1):e1900738. doi: 10.1002/mnfr.201900738.
206. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2010 Sep;69(9):1580–8. doi: 10.1136/ard.2010.138461.
207. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988 Mar;31(3):315–24. doi: 10.1002/art.1780310302.
208. Bruce B, Fries JF. The health assessment questionnaire (HAQ). *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23 Suppl 39:S14–S18.
209. Gossec L, Dougados M, Rinccheval N, Balanescu A, Boumpas DT, Canadelo S, Carmona L, Daurès JP, de Wit M, Dijkmans BA, Englbrecht M, Gunendi Z, Heiberg T, Kirwan JR, Mola EM, Matucci-Cerinic M, Otsa K, Schett G, Sokka T, Wells GA, Aanerud GJ, Celano A, Dudkin A, Hernandez C, Koutsogianni K, Akca FN, Petre AM,

- Richards P, Scholte-Voshaar M, Von Krause G, Kvien TK. Elaboration of the preliminary Rheumatoid Arthritis Impact of Disease (RAID) score: A EULAR initiative. *Ann Rheum Dis*. 2009 Nov;68(11):1680–5. doi: 10.1136/ard.2008.100271.
210. Prevoe ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995 Jan;38(1):44–8. doi: 10.1002/art.1780380107.
211. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S1–S8. doi: 10.1111/jcpe.12935.
212. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jul 1;43(W1):W566–70. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv468>
213. Fan P, He L, Hu N, Luo J, Zhang J, Mo LF, Wang YH, Pu D, Lv XH, Hao ZM, Ding CH, Xue WJ, Li Y. Effect of 1,25-(OH)₂D₃ on proliferation of fibroblast-like synoviocytes and expressions of pro-inflammatory cytokines through regulating MicroRNA-22 in a rat model of rheumatoid arthritis. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42(1):145–155. doi: 10.1159/000477123.
214. Zwerina K, Baum W, Axmann R, Heiland GR, Distler JH, Smolen J, Hayer S, Zwerina J, Schett G. Vitamin D receptor regulates TNF-mediated arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jun;70(6):1122–9. doi: 10.1136/ard.2010.142331.
215. Hajjaj-Hassouni N, Mawani N, Allali F, Rkain H, Hassouni K, Hmamouchi I, Dougados M. Evaluation of vitamin D status in rheumatoid arthritis and its association with disease activity across 15 countries: "The COMORA Study". *Int J Rheumatol*. 2017;2017:5491676. doi: 10.1155/2017/5491676.
216. Lee YH, Bae SC. Vitamin D level in rheumatoid arthritis and its correlation with the disease activity: A meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol*. 2016 Sep-Oct;34(5):827–833.
217. Polasik K, Piotrowska E, Lipińska B, Witkowski JM, Bryl E, Tukaj S. Vitamin D status in patients with rheumatoid arthritis: A correlation analysis with disease activity and progression, as well as serum IL-6

- levels. *Acta Biochim Pol.* 2017;64(4):667-670. doi: 10.18388/abp.2017_1636.
218. Higgins MJ, Mackie SL, Thalayasingam N, Bingham SJ, Hamilton J, Kelly CA. The effect of vitamin D levels on the assessment of disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2013 Jun;32(6):863–7. doi: 10.1007/s10067-013-2174-x.
219. Garcia-Lozano JR, Gonzalez-Escribano MF, Valenzuela A, Garcia A, Núñez-Roldán A. Association of vitamin D receptor genotypes with early onset rheumatoid arthritis. *Eur J Immunogenet.* 2001 Feb;28(1):89–93. doi: 10.1046/j.1365-2370.2001.00233.x.
220. Goertz B, Fassbender WJ, Williams JC, Marzeion AM, Bretzel RG, Stracke H, Berliner MN. Vitamin D receptor genotypes are not associated with rheumatoid arthritis or biochemical parameters of bone turnover in German RA patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2003 May-Jun;21(3):333–9.
221. Maalej A, Petit-Teixeira E, Michou L, Rebai A, Cornelis F, Ayadi H. Association study of VDR gene with rheumatoid arthritis in the French population. *Genes Immun.* 2005 Dec;6(8):707–11. doi: 10.1038/sj.gene.6364260.
222. Sassi F, Tamone C, D'Amelio P. Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator. *Nutrients.* 2018 Nov 3;10(11):1656. doi: 10.3390/nu10111656.
223. Rodríguez-Carrio J, Alperi-López M, Naves-Díaz M, Dusso A, López P, Ballina-García FJ, Cannata-Andía JB, Suárez A. Vitamin D receptor polymorphism and DHCR7 contribute to the abnormal interplay between vitamin D and lipid profile in rheumatoid arthritis. *Sci Rep.* 2019 Feb 22;9(1):2546. doi: 10.1038/s41598-019-38756-8.
224. Monticielo OA, Brenol JC, Chies JA, Longo MG, Rucatti GG, Scalco R, Xavier RM. The role of BsmI and FokI vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2012 Jan;21(1):43–52. doi: 10.1177/0961203311421798.
225. Agnello L, Scazzone C, Ragonese P, Salemi G, Lo Sasso B, Schillaci R, Musso G, Bellia C, Ciaccio M. Vitamin D receptor polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D in a group of Sicilian multiple sclerosis patients. *Neurol Sci.* 2016 Feb;37(2):261–7. doi: 10.1007/s10072-015-2401-0.
226. Coşkun S, Şimşek Ş, Camkurt MA, Çim A, Çelik SB. Association of polymorphisms in the vitamin D receptor gene and serum 25-

- hydroxyvitamin D levels in children with autism spectrum disorder. *Gene*. 2016 Aug 22;588(2):109–14. doi: 10.1016/j.gene.2016.05.004.
227. van Etten E, Verlinden L, Giulietti A, Ramos-Lopez E, Branisteanu DD, Ferreira GB et al. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: Functional impact on the immune system. *Eur J Immunol*. 2007;37:395–405.
228. Shirvani SS, Nouri M, Sakhinia E, Babaloo Z, Jadideslam G, Shahriar A, Farhadi J, Khabbazi A. The expression and methylation status of vitamin D receptor gene in Behcet's disease. *Immun Inflamm Dis*. 2019 Dec;7(4):308–317. <https://doi:10.1002/iid3.275>
229. Zhao R, Gu C, Zhang Q, Zhou W, Feng G, Feng X, Dong C, Gu Z. Periodontal disease in Chinese patients with rheumatoid arthritis: A case-control study. *Oral Dis*. 2019 Nov;25(8):2003–2009. doi: 10.1111/odi.13176.
230. Lee KH, Choi YY. Rheumatoid arthritis and periodontitis in adults: Using the Korean National Health Insurance Service-National Sample Cohort. *J Periodontol*. 2020 Sep;91(9):1186–1193. doi: 10.1002/JPER.19-0311.
231. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: A systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014 Nov;93(11):1045–53. doi: 10.1177/0022034514552491.
232. Rodríguez-Lozano B, González-Febles J, Garnier-Rodríguez JL, Dadlani S, Bustabad-Reyes S, Sanz M, Sánchez-Alonso F, Sánchez-Piedra C, González-Dávila E, Díaz-González F. Association between severity of periodontitis and clinical activity in rheumatoid arthritis patients: A case-control study. *Arthritis Res Ther*. 2019 Jan 18;21(1):27. doi: 10.1186/s13075-019-1808-z.
233. Mikuls TR, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Reynolds RJ, Cannon GW, Markt J, McGowan D, Kerr GS, Redman RS, Reimold A, Griffiths G, Beatty M, Gonzalez SM, Bergman DA, Hamilton BC 3rd, Erickson AR, Sokolove J, Robinson WH, Walker C, Chandad F, O'Dell JR. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014 May;66(5):1090–100. doi: 10.1002/art.38348.
234. Eriksson K, Fei G, Lundmark A, Benchimol D, Lee L, Hu YOO, Kats A, Saevarsdottir S, Catrina AI, Klinge B, Andersson AF, Klareskog L, Lundberg K, Jansson L, Yucel-Lindberg T. Periodontal health and oral microbiota in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Med*. 2019 May 8;8(5):630. doi: 10.3390/jcm8050630.

235. Payne JB, Golub LM, Thiele GM, Mikuls TR. The link between periodontitis and rheumatoid arthritis: A periodontist's perspective. *Curr Oral Health Rep.* 2015;2(1):20–29. doi: 10.1007/s40496-014-0040-9.
236. Golub LM, Payne JB, Reinhardt RA, Nieman G. Can systemic diseases co-induce (not just exacerbate) periodontitis? A hypothetical "two-hit" model. *J Dent Res.* 2006 Feb;85(2):102–5. doi: 10.1177/154405910608500201.
237. Coat J, Demoersman J, Beuzit S, Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Saraux A, Pers JO. Anti-B lymphocyte immunotherapy is associated with improvement of periodontal status in subjects with rheumatoid arthritis. *J Clin Periodontol.* 2015 Sep;42(9):817–823. doi: 10.1111/jcpe.12433.
238. Kobayashi T, Okada M, Ito S, Kobayashi D, Ishida K, Kojima A, Narita I, Murasawa A, Yoshie H. Assessment of interleukin-6 receptor inhibition therapy on periodontal condition in patients with rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2014 Jan;85(1):57–67. doi: 10.1902/jop.2013.120696.
239. Eezammuddeen, N.N., Vaithilingam, R.D., Hassan, N.H.M. et al. Association between rheumatoid arthritis and periodontitis: Recent progress. *Curr Oral Health.* 2020; Rep 7, 139–153. <https://doi.org/10.1007/s40496-020-00264-4>
240. Zamri F, de Vries TJ. Use of TNF Inhibitors in rheumatoid arthritis and implications for the periodontal status: For the benefit of both? *Front Immunol.* 2020 Oct 23;11:591365. doi: 10.3389/fimmu.2020.591365.
241. Savioli C, Ribeiro AC, Fabri GM, Calich AL, Carvalho J, Silva CA, Viana VS, Bonfá E, Siqueira JT. Persistent periodontal disease hampers anti-tumor necrosis factor treatment response in rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol.* 2012 Jun;18(4):180–4. doi: 10.1097/RHU.0b013e31825828be.
242. Fabri GM, Pereira RM, Savioli C, Saad CG, de Moraes JC, Siqueira JT, Bonfa E. Periodontitis response to anti-TNF therapy in ankylosing spondylitis. *J Clin Rheumatol.* 2015 Oct;21(7):341–5. doi: 10.1097/RHU.0000000000000300.
243. Leite FRM, Nascimento GG, Scheutz F, López R. Effect of smoking on periodontitis: A systematic review and meta-regression. *Am J Prev Med.* 2018 Jun;54(6):831–841. doi: 10.1016/j.amepre.2018.02.014.

244. Chang K, Yang SM, Kim SH, Han KH, Park SJ, Shin JI. Smoking and rheumatoid arthritis. *Int J Mol Sci.* 2014 Dec 3;15(12):22279–95. doi: 10.3390/ijms151222279.
245. Kostoglou-Athanassiou I, Athanassiou P, Lyraki A, Raftakis I, Antoniadis C. Vitamin D and rheumatoid arthritis. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2012 Dec;3(6):181–7. doi: 10.1177/2042018812471070.
246. Khammissa RAG, Ballyram R, Jadwat Y, Fourie J, Lemmer J, Feller L. Vitamin D deficiency as it relates to oral immunity and chronic periodontitis. *Int J Dent.* 2018 Oct 1;2018:7315797. doi: 10.1155/2018/7315797.

9. PRIEDAI

9.1. Publikacijų sąrašas

Straipsniai, publikuoti tarptautinės duomenų bazės *Clarivate Analytics Web of Science (CA WoS)* referuojamuose leidiniuose su citavimo indeksu:

1. **Puncevičienė E**, Gaizevska J, Sabaliauskaite R, Vencevičienė L, Puriene A, Vitkus D, Jarmalaite S, Butrimiene I. Vitamin D and VDR gene polymorphisms' association with rheumatoid arthritis in Lithuanian population. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Apr 3;57(4):346. doi: 10.3390/medicina57040346.
2. **Puncevičienė E**, Rovas A, Puriene A, Stuopelyte K, Vitkus D, Jarmalaite S, Butrimiene I. Investigating the relationship between the severity of periodontitis and rheumatoid arthritis: A cross-sectional study. *Clin Rheumatol*. 2021 Aug;40(8):3153-3160. doi: 10.1007/s10067-021-05661-3.

Straipsnis, publikuotas kitame tarptautinių duomenų bazių leidinyje:

3. **Puncevičienė E**, Gaizevska J, Sabaliauskaite R, Snipaitienė K, Vencevičienė L, Vitkus D, Jarmalaite S, Butrimiene I. Analysis of epigenetic changes in vitamin D pathway genes in rheumatoid arthritis patients. *Acta medica Lituanica*. 2022; 29(1), p. 7. doi: 10.15388/Amed.2021.29.1.7.

Kiti straipsniai, susiję su disertacijoje nagrinėjama tema, tačiau netiesiogiai su disertacijoje keliamais uždaviniais, publikuoti doktorantūros studijų metu tarptautinės duomenų bazės *Clarivate Analytics Web of Science (CA WoS)* referuojamuose leidiniuose su citavimo indeksu:

1. Vojinovic J, Tincani A, Sulli A, Soldano S, Andreoli L, Dall'Ara F, Ionescu R, Pasalic KS, Balcune I, Ferraz-Amaro I, Tlustochowicz M, Butrimiene I, **Puncevičienė E**, Toroptsova N, Grazio S, Morovic-Vergles J, Masaryk P, Otsa K, Bernardes M, Boyadzhieva V, Salaffi F, Cutolo M. European multicentre pilot survey to assess vitamin D status in rheumatoid arthritis patients and early development of a new Patient Reported Outcome questionnaire (D-PRO). *Autoimmun Rev*. 2017 May;16(5):548–554. doi: 10.1016/j.autrev.2017.03.002.
2. Salaffi F, Di Carlo M, Vojinovic J, Tincani A, Sulli A, Soldano S, Andreoli L, Dall'Ara F, Ionescu R, Simić Pašalić K, Balčune I, Ferraz-

- Amaro I, Tlustochowicz M, Butrimienė I, **Puncevičienė E**, Toroptsova N, Grazio S, Morović-Vergles J, Masaryk P, Otsa K, Bernardes M, Boyadzhieva V, Cutolo M. Validity of the rheumatoid arthritis impact of disease (RAID) score and definition of cut-off points for disease activity states in a population-based European cohort of patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2018 May;85(3):317–322. doi: 10.1016/j.jbspin.2017.05.020.
3. Rovas A, Puriene A, Snipaitiene K, **Puncevičienė E**, Buragaite-Staponkiene B, Matuleviciute R, Butrimiene I, Jarmalaite S. Analysis of periodontitis-associated miRNAs in gingival tissue, gingival crevicular fluid, saliva and blood plasma. *Arch Oral Biol*. 2021 Jun;126:105125. doi: 10.1016/j.archoralbio.2021.105125.
 4. Rovas A, Puriene A, **Puncevičienė E**, Butrimiene I, Stuopelyte K, Jarmalaite S. Associations of periodontal status in periodontitis and rheumatoid arthritis patients. *J Periodontal Implant Sci*. 2021 Apr;51(2):124–134. doi: 10.5051/jpis.2006060303.
 5. Rovas A, Puriene A, Snipaitiene K, **Puncevičienė E**, Buragaite-Staponkiene B, Matuleviciute R, Butrimiene I, Jarmalaite S. Gingival crevicular fluid microRNA associations with periodontitis. *J. Oral Sci*. 2021 Oct. doi.org/10.2334/josnusd.21-0282.

9.2. Pranešimai mokslinėse konferencijose

1. **Puncevičienė, Eglė**; Butrimienė, Irena; Vitkus, Dalius. Vitamin D status and disease activity in rheumatoid arthritis patients. Baltijos šalių reumatologų konferencija (angl. *Baltic Rheumatology Conference*), 2017 m. rugsėjo 21–22 d., Vilnius, Lietuva.
2. **Puncevičienė, Eglė**; Gaiževska, Justina; Sabaliauskaitė, Rasa; Vencevičienė, Lina; Vitkus, Dalius; Jarmalaitė, Sonata; Butrimienė, Irena. Methylation analysis of vitamin D signaling pathway genes in rheumatoid arthritis patients. Europos priešreumatinės lygos kongresas (angl. *European League Against Rheumatism, EULAR*), 2020 birželio 3–6 d., E-kongresas.
3. Gaiževska, Justina; **Puncevičienė, Eglė**; Vencevičienė, Lina; Sabaliauskaitė, Rasa; Jarmalaitė, Sonata; Butrimienė, Irena. Vitamin D receptor gene polymorphism distribution and methylation analysis of vitamin D metabolic pathway genes in Lithuanian rheumatoid arthritis patients. COINS 2019 - 14th international conference of life sciences, 2019 m. vasario 26–28 d., Vilnius, Lietuva.

4. **Puncevičienė Eglė** „Vitamino D įtaka klinikinei reumatoidinio artrito eigai“. Pristatytas žodinis pranešimas konferencijoje „Jaunųjų reumatologų mokykla“, 2019 m. gegužės 18–19 d., Kėdainiai, Lietuva.

Stendinis pranešimas, susijęs su disertacijoje nagrinėjama tema, tačiau netiesiogiai su disertacijoje keliamais uždaviniais:

1. Gerulaitytė, Aistė; Vaicekauskaitė, Ieva; Gaiževska, Justina; **Puncevičienė, Eglė**; Vencevičienė, Lina; Sabaliauskaitė, Rasa; Butrimienė, Irena; Jarmalaitė, Sonata. Plasma microRNA profiles as a potential diagnostic biomarker of rheumatoid arthritis. COINS 2020: international conference of life sciences, 2020 m. vasario 25–27, Vilnius, Lietuva

9.3. Moksliniai projektai vykdyti doktorantūros studijų laikotarpiu

2017–2021 m. vykdytas Lietuvos Mokslo Tarybos finansuotas mokslininkų grupių projektas Nr. S-MIP-17-12 „Imunologinių, genetinių, epigenetinių veiksnių analizė autoimuninių artritų etiopatogenezėje“, vadovė prof. dr. I. Butrimienė. Vykdančioji institucija: Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras. Gautos lėšos panaudotos atliekant doktorantūros darbo genetinius ir epigenetinius tyrimus. Doktorantė E. Puncevičienė – projekto vykdytoja.

Projektas, iš dalies susijęs su doktorantūros darbu

2017–2021 m. vykdytas mokslinis projektas Nr. 01.2.2-LMT-K-718-01-0023 „Lėtinio periodontito uždegiminio aktyvumo diagnostikos ir gydymo gerinimo tyrimas“, finansuotas Europos regioninės plėtros fondo lėšomis pagal priemonės Nr. 01.2.2-LMT-K-718 veiklą „Aukšto lygio tyrėjų grupių vykdomi moksliniai tyrimai“. Projekto vadovė prof. dr. A. Pūrienė. Vykdančioji institucija: VUL Žalgirio klinikos. Doktorantė E. Puncevičienė – projekto vykdytoja.

9.4. Tiriamųjų anketos

REUMATOIDINIŲ ARTRITŲ SERGANČIŲ TIRIAMŲJŲ ANKETA

TIRIAMOJO

KODAS _____

Vizito data

(metai/mėnuo/diena) _____

Kraujo mėginio paėmimo data

(metai/mėnuo/diena) _____

Gimimo data (metai) _____

Lytis:

Vyras

Moteris

Ūgis (cm) _____

KMI _____

Svoris (kg) _____

Rūkymas:

Taip

Ne

Cigarečių vnt./d. _____

Susirgimo data (metai/mėnuo) _____

Reumatoidinio artrito diagnozės patvirtinimo data (metai/mėnuo)

Imunologiniai laboratoriniai tyrimai

RF (konc.)	ACCP (konc.)
Neigiamas <input type="checkbox"/>	Neigiamas <input type="checkbox"/>
Silpnai teigiamas <input type="checkbox"/> (<3k./padidėjimas)	Silpnai teigiamas <input type="checkbox"/> (<3k./padidėjimas)
Stipriai teigiamas <input type="checkbox"/> (>3k./padidėjimas)	Stipriai teigiamas <input type="checkbox"/> (>3k./padidėjimas)

Ligos aktyvumo rodikliai:

	Rezultatas	Normos ribos
ENG (mm/h)		
CRB (mg/l)		

Šiuo metu skiriamas RA gydymas

Pavadinimas	Vartojimo būdas (p/os, p/o, i/v)	Dozė	Vaisto paskyrimo data (metai/mėnuo)
Prednizolonas			
Metilprednizolonas			
Metotreksatas			
Leflunomidas			
Azatioprinas			
Sulfasalazinas			
Plakvenilis			
Biologinė terapija:			

Anksčiau skirtas RA gydymas

Pavadinimas	Vartojimo pradžios data (metai/mėnuo)	Nutraukimo data (metai/mėnuo)
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		

Vitamino D papildų vartojimas TAIP

NE

Vitamino D papildų vartojimas	Papildo forma (lašai, ampulė, kapsulės)	Dozė (TV, mkg) 1 mkg = 40 TV	Vartojimo pradžia (metai/mėnuo)

Gretutinės ligos

Diagnozė	Dgn. nustatymo data (metai/mėnuo)	Taikomas gydymas

Chirurginis gydymas

Diagnozė	Operacijos data (metai/mėnuo)

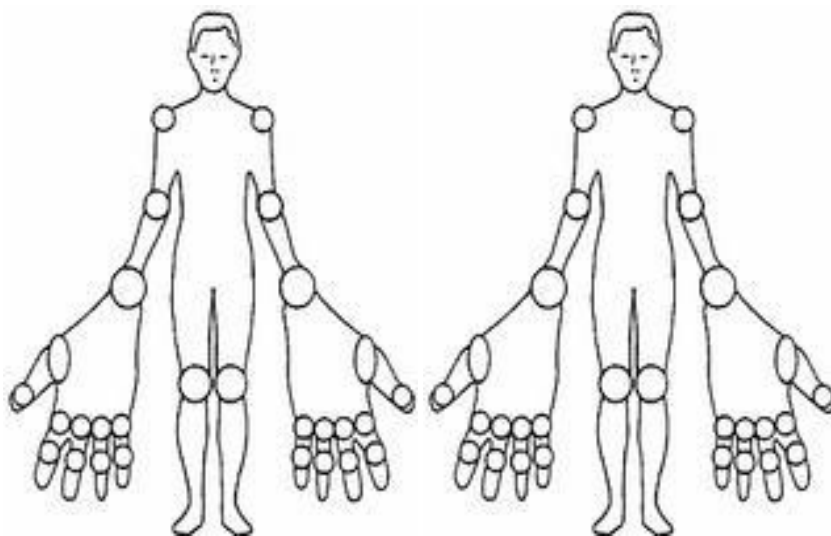
Vitamino D konc.

25(OH)D konc.kr.serume		nmol/l
------------------------	--	--------

DAS28

Skausmingi sąnariai

Sutinę sąnariai



Skaičius

Skaičius

Paciento savijautos

globalinis vertinimas(mm)

ENG

CRB

Sutinę sąnariai 28

Skausmingi sąnariai 28

1. Paciento bendras savijautos vertinimas:

Kaip Jūs jaučiatės dėl sąnarių ligos (pastarąją savaitę)

Labai gerai _____ Labai blogai _____

Skausmo lygis (pastarąją savaitę)

Kokio stiprumo skausmus jaučiate?

Visai nejaučiu _____ Stipriausius kokius tik įmanoma

Gydytojo ligos aktyvumo vertinimas (pildo gydytojas)

Neaktyvi liga _____ Labai aktyvi liga _____

Reumatoidinio artrito ligos poveikio (RAID) klausimyno rezultatai

	Balas
Skausmas	
Funkcinis neįgalumas	
Nuovargis	
Miegas	
Fizinė savijauta	
Emocinė savijauta	
Reumatoidinio artrito įveikimas	
IŠ VISO	

Sveikatos vertinimo klausimyno (SVK) rezultatai

	Balas
1 skiltis	
2 skiltis	
3 skiltis	
4 skiltis	
5 skiltis	
6 skiltis	
7 skiltis	
8 skiltis	
IŠ VISO	

SVEIKATOS VERTINIMO KLAUSIMYNAS (SVK)

Kokius iš toliau išvardintų veiksmų Jūs galėjote atlikti per pastarąsias keturias savaites? Pažymėkite labiausiai tinkantį atsakymą.	Galiu be sunkumų	Sunkokai	Tik su kito asmens pagalba	Negaliu
<i>1. Apsirengimas ir susitvarkymas</i>				
apsirengti, užsisiegti sagas, užtrauktuką, kabliukus, užsirišti batus	0	1	2	3
išsiplauti galvą	0	1	2	3
<i>2. Atsikėlimas</i>				
atsikelti nuo kėdės nesiremdamas rankomis	0	1	2	3
įlipti į lovą ir jos	0	1	2	3
<i>3. Valgymas</i>				
supjaustyti mėsą	0	1	2	3
pakelti pilną stiklinę prie lūpų	0	1	2	3
atidaryti pieno paketį	0	1	2	3
<i>4. Vaikščiojimas</i>				
ar Jūs galėtumėte išeiti iš namų į lauką, jeigu nereikėtų lipti laiptais	0	1	2	3
užlipti penkis laiptelius aukštyn	0	1	2	3
<i>5. Higiena</i>				
nusiprausti ir nusišluostyti visą savo kūną	0	1	2	3
naudotis vonia, t.y. įlipti ir išlipti	0	1	2	3
atsisėsti ir atsikelti nuo klozeto	0	1	2	3

6.Siekimas				
paimti (pasiekti) galvos aukštyje ir nuleisti žemyn 2 kg sveriantį daiktą (tokį, kaip miltų maišelis)	0	1	2	3
pasilenkti ir paimti drabužius nuo grindų	0	1	2	3
7.Griebimas				
atidaryti „užspaustas“ mašinos duris	0	1	2	3
atidaryti užsukamą stiklainį, kuris prieš tai jau buvo kartą atidarytas	0	1	2	3
atsukti ar užsukti čiaupą	0	1	2	3
8.Aktyvumas				
atlikti namų ruošos darbus ir apsipirkti	0	1	2	3
įlipti į mašiną ir iš jos išlipti	0	1	2	3
išsiurbti kambarius ar darbuotis sode	0	1	2	3

REUMATOIDINIO ARTRITO LIGOS POVEIKIO KLAUSIMYNAS (RAID)

1. Skausmas

Apibraukite skaičių, kuris geriausiai apibūdina skausmą, kurį jautėte dėl reumatoidinio artrito per praėjusias 7 dienas:

Visiškai nejaučiau	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Labai stiprus
-----------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	------------------

2. Funkcinis neįgalumas

Apibraukite skaičių, kuris geriausiai apibūdina, kaip jums buvo sunku dėl reumatoidinio artrito, atliekant kasdienę fizinę veiklą per praėjusias 7 dienas.

Visai nesunku	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Labai sunku
------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----------------

3. Nuovargis

Apibraukite skaičių, kuris geriausiai apibūdina, kaip jums buvo sunku dėl reumatoidinio artrito atlikti kasdieninę fizinę veiklą per praėjusias 7 dienas.

Nejaučiau nuovargio	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Buvau visiškai išsekęs (-usi)
------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	--

4. Miegas

Apibraukite skaičių, kuris geriausiai apibūdina miego problemas (t.y. poilsį naktį), kurias patyrėte dėl reumatoidinio artrito per praėjusias 7 dienas.

Jokių problemų	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Labai didelės problemos
-------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	-------------------------------

5. Fizinė savijauta

Bendrai atsižvelgiant į artritą, kuriuo sergate, kaip jūs įvertintumėte savo fizinę savijautą per praėjusias 7 dienas? Apibraukite skaičių, kuris geriausiai apibūdina jūsų fizinę savijautą.

Labai gera	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Labai bloga
---------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----------------

6. Emocinė savijauta

Bendrai atsižvelgiant į artritą, kuriuo sergate, kaip jūs įvertintumėte savo emocinę savijautą per praėjusias 7 dienas? Apibraukite skaičių, kuris geriausiai apibūdina jūsų emocinę savijautą.

Labai gera	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Labai bloga
---------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----------------

7. Reumatoidinio artrito įveikimas

Bendrai atsižvelgiant į artritą, kuriuo sergate, kaip jums pavyko įveikti savo ligą (susitvarkyti su ja) per praėjusias 7 dienas?

Labai gerai	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Labai blogai
----------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	-----------------

ODONTOLOGINĖ TIRIAMOJO ANKETA

Tiriamajo kodas _____

- 1) Jūsų amžius:.....
- 2) Lytis: : V M
- 3) Jūsų ūgis:.....
- 4) Jūsų svoris:.....
- 5) Ar rūkote?
 - Niekada nerūkiu
 - Anksčiau rūkiu, bet dabar nerūkau
 - Taip, iki 20 cig. per dieną
 - Taip, daugiau nei 20 cig. per dieną
- 6) Ar dažnai vartojate alkoholi?
 - Niekada
 - Maždaug 1 kartą per mėnesį
 - Maždaug 1 kartą per savaitę
 - Kasdien
- 7) Koks Jūsų išsilavinimas?
 - Vidurinis
 - Aukštasis neuniversitetinis
 - Aukštasis universitetinis
- 8) Kaip dažnai valotės dantis su dantų šepetėliu?
 - Nesivalau dantų
 - 1 kartą per dieną
 - 2 ar daugiau kartų per dieną
- 9) Ar naudojate tarpdančių šepetėlį/tarpdančių siūlą?
 - Taip
 - Ne

10) Vidutiniškai kaip dažnai apsilankote pas gyd. odontologą?

Nesilankau

Rečiau nei 1 kartą per metus

1 kartą per metus

2 ir daugiau kartų per metus

11) Pašalintų dantų skaičius:.....

12) Dantų implantų skaičius:.....

KONTROLINĖS GRUPĖS ANKETA

TIRIAMOJO KODAS _____

Vizito data (metai/mėnuo/diena) _____

Kraujo mėginio paėmimo data (metai/mėnuo/diena) _____

Gimimo data (metai) _____

Lytis: Vyras Moteris

Ūgis (cm) _____ KMI _____

Svoris (kg) _____

Rūkymas: Taip Ne

Cigarečių vnt/d. _____

Vitamino D papildų vartojimas TAIP NE

Vitamino D papildų vartojimas	Papildo forma (lašai, ampulė, kapsulės)	Dozė (TV, mkg) 1 mkg = 40 TV	Vartojimo pradžia (metai/mėnuo)

Gretutiniai susirgimai

Diagnozė	Dgn. nustatymo data (metai/mėnuo)	Taikomas gydymas

Laboratoriniai tyrimai

25(OH)D konc.kr.serume		nmol/l
------------------------	--	--------

9.5. Leidimai atlikti biomedicininį tyrimą



VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Viešoji įstaiga, Universiteto g. 3, LT- 01513 Vilnius, tel. (8 5) 268 7001, faks. (8 5) 272 8646, el. p. infor@cr.vu.lt

Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810.

Fakulteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8701, (8 5) 239 7800, faks. (8 5) 239 8705, el. p. mf@mf.vu.lt

VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mf.vu.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2016-11-08 Nr.158200-16-864-379

Tyrimo pavadinimas:

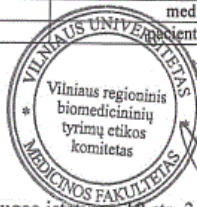
Reumatoidinio artrito etiopatogenezės ir klinikinės eigos sąsajos su genetiniais ir epigenetiniais veiksniais

Protokolo Nr.:	2
Versija:	2
Data:	2016-09-29
Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma:	Tiriamųjų grupei
Versija:	2
Data:	2016-09-30
Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma:	Kontrolinei grupei
Versija:	2
Data:	2016-09-30
Priedas Nr. 1	Reumatoidiniu artritu sergančių tiriamųjų anketa
Versija:	1
Data:	2016-08-12
Priedas Nr. 2	Kontrolinės grupės anketa
Versija:	1
Data:	2016-08-12
Priedas Nr. 3	D-PRO klausimynas (Simptomai ir Jutimai)
Versija:	-
Data:	2013-09-17
Priedas Nr. 4	Sveikatos vertinimo klausimynas (Būitis)
Versija:	1
Data:	2012 m.
Priedas Nr. 5	Reumatoidinio artrito poveikis (RAID klausimynas) lietuviška versija
Versija:	2012-01-12
Data:	
Pagrindinis tyrėjas:	Irena Butrimienė
Įstaigos pavadinimas:	VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikos Reumatologijos centras; Reumatologijos, traumatologijos-ortopedijos ir rekonstrukcinės chirurgijos klinika Santariškių g. 2, LT-08661 Vilnius
Adresas:	
Leidimas galioja iki:	2019-10-31

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2016/11), vykusio 2016 m. lapkričio 08 d. sprendimu.

Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, pavardė	veiklos sritis	dalyvavo posėdyje
1	doc. dr. Laimutė Jakavonytė	filosofija	taip
2	prof.dr. Jolanta Dadonienė	epidemiologija, medicina	taip
3	doc.dr. Jaunius Gumbis	teisė	ne
4	Genovaitė Bulzgytė	slauga	taip
5	prof.dr. Augustina Jankauskienė	medicina	taip
6	dr. Laura Malinauskienė	medicina	taip
7	Eglė Zubiene	psichologija	taip
8	prof. Saulius Vosylius	medicina	taip
9	Ugnė Šaktienė	pacientų teisės	taip

Pirmininkė



Laura Malinauskienė

LR Asmens duomenų teisinės apsaugos įstatyme 10 str. 3 punktą numato, jog asmens duomenys apie asmens sveikatą automatinio būdu, taip pat mokslinio **medicininio tyrimo** tikslais gali būti tvarkomi tik pranešus Valstybinei duomenų apsaugos inspekcijai. Šiuo atveju Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija privalo atlikti išankstinę patikrą.

Pasibaigus tyrimui, tyrėjas ar tyrimo užsakovas privalo informuoti VRBTEK raštu apie tyrimo pabaigą bei pateikti tyrimo ataskaitos santrauką.

Reikalavimas pateikti pranešimą apie tyrimo pabaigą bei ataskaitos santrauką įsigaliojo nuo 2010 m. gegužės 6 d. Šį reikalavimą rasite Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymo "Dėl leidimų atlikti biomedicininį tyrimą išdavimo tvarkos aprašo patvirtinimo" (Žin., 2008, Nr. 6-225; 2010, Nr. 55-2706; 2011, Nr. 233-1570; Nr. 67-3184) 18¹ punkte „*Leidimas atlikti biomedicininį tyrimą galioja iki biomedicininio tyrimo paraiškoje nurodytos tyrimo pabaigos datos. Biomedicininų tyrimų užsakovas, jo įgaliotas atstovas ir (ar) pagrindinis tyrėjas per 30 kalendorinių dienų privalo raštu pranešti leidimą atlikti biomedicininį tyrimą išdavusiai institucijai (Lietuvos bioetikos komitetui ar regioniniam biomedicininų tyrimų etikos komitetui) apie tyrimo pabaigą ir per 90 kalendorinių dienų pateikti tyrimo vykdymo ataskaitos santrauką*“.

Įsakymo nuostata taikoma visiems biomedicininėms tyrimams.



VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Viešoji įstaiga, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius. Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810
Fakulteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, 03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8700, el. p. mfi@mf.vu.lt

VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

Komiteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, 03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mf.vu.lt

**LEIDIMAS
ATLIKTI BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ**

2018-05-08 Nr.158200-18/5-1037-533

Tyrimo pavadinimas:


**Imunologinių, genetinių, epigenetinių veiksnių analizė
autoimuninių artritų etiopatogenezėje**

Protokolo Nr.:	2
Versija:	2
Data:	2018 05 02
Informuoto asmens sutikimo forma:	2 (Autoimuninio artrito grupė) 2018 05 02 2 (Kelio sąnario biopsija) 2018 05 02 2 (Kontrolinė grupė) 2018 05 02
Pagrindinis tyrėjas:	Irena Butrimienė
Įstaigos pavadinimas: Adresas:	VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos Santariškių g. 2, Vilnius Vilniaus Universitetas Universiteto g. 3, Vilnius Valstybinis mokslinių tyrimų institutas, Inovatyvios medicinos centras Santariškių g. 5, Vilnius
Leidimas galioja iki:	2020 09 30

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2018/5), vykusio 2018 m. gegužės 8 d. sprendimu.

Pirmininkas



 prof. Saulius Vosylius

LR Asmens duomenų teisinės apsaugos įstatymo 10 str. 3 punktas numato, jog asmens duomenys apie asmens sveikatą automatinio būdu, taip pat mokslinio **medicininio tyrimo tikslais** gali būti tvarkomi tik pranešus Valstybinei duomenų apsaugos inspekcijai. Šiuo atveju Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija privalo atlikti išankstinę patikrą.

LR Asmens duomenų teisinės apsaugos įstatymo 12 str. 1 punktas numato, kad **be duomenų subjekto sutikimo** asmens duomenys **mokslinio tyrimo tikslais** gali būti tvarkomi tik pranešus Valstybinei duomenų apsaugos inspekcijai. Šiuo atveju Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija privalo atlikti išankstinę patikrą.

Pasibaigus tyrimui privaloma VRBTEK raštu informuoti apie tyrimo pabaigą bei pateikti tyrimo ataskaitos santrauką.

Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymo "Dėl leidimų atlikti biomedicininį tyrimą išdavimo tvarkos aprašo patvirtinimo" (*Žin., 2008, Nr. 6-225, 2016 m. sausio 8 įsakymo Nr. V-27 redakcija (galiojanti suvestinė redakcija (nuo 2017-01-04)*) VII.40. Leidimas atlikti biomedicininį tyrimą galioja iki biomedicininio tyrimo paraiškoje nurodytos tyrimo pabaigos datos. VII.41. Biomedicininį tyrimų užsakovas, jo įgaliotas atstovas ar pagrindinis tyrėjas per **30 kalendorinių dienų** nuo biomedicininio tyrimo pabaigos **privalo raštu pranešti** leidimą išdavusiam Lietuvos bioetikos komitetui ar regioniniam biomedicininį tyrimų etikos komitetui apie biomedicininio tyrimo pabaigą ir per **90 kalendorinių dienų** nuo biomedicininio tyrimo pabaigos **pateikti** biomedicininio tyrimo **vykdymo ataskaitos santrauką**.

Įsakymo nuostata taikoma visiems biomedicininiam tyrimams.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 20 egz.