

Imuninis atsakas atopijos metu: vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmas

IMMUNE RESPONSE IN ATOPY: POLYMORPHISM OF VITAMIN D RECEPTOR AND
VITAMIN D-BINDING PROTEIN GENES

DAINA PAVALKIENĖ

LSMU MA MF Imunologijos ir alergologijos klinika

Santrauka. 2025 m. vasario 21 d. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto viešajame Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje Daina Pavalkienė sėkmingai apgynė daktaro disertaciją „Imuninis atsakas atopijos metu: vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmas“. Disertacija rengta 2020–2024 m. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos fakulteto Imunologijos ir alergologijos klinikoje. Šiame straipsnyje pateikiami pagrindiniai disertacijos rezultatai.

Mokslinė vadovė:

prof. dr. Brigita Gradauskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Disertacijos gynimo taryba:

prof. habil. dr. Vaiva Lesauskaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

prof. dr. Edgaras Stankevičius (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

prof. dr. Vilmantė Borutaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

prof. dr. Algimantas Paulauskas (Vytauto didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

prof. dr. Madeleine Radinger (Geteborgo universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Summary. Daina Pavalkienė successfully defended a doctoral dissertation “Immune response in atopy: polymorphism of vitamin D receptor and vitamin D-binding protein genes” at the open session of the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on February 21, 2025. The dissertation has been prepared at the Department of Immunology and Allergology of Faculty of Medicine of Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2020–2024 year. The article presents the main results of the dissertation.

Scientific Supervisor:

Prof. Dr. Brigita Gradauskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

The Defense Council:

Prof. Habil. Dr. Vaiva Lesauskaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

Prof. Dr. Edgaras Stankevičius (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

Prof. Dr. Vilmantė Borutaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

Prof. Dr. Algimantas Paulauskas (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Biology – N 010).

Prof. Dr. Madeleine Radinger (University of Gothenburg, Natural Sciences, Biology – N 010).

DOI: <https://doi.org/10.37499/PIA.1742>

IVADAS

Atopija – tai genetiškai predisponuojantis sutrikimas, susijęs su alerginėmis reakcijomis, sukeltomis dėl suaktyvėjusio imunoglobulino E (IgE) atsako į aplinkos alergenų [1]. Ši būklė yra sudėtinga, nevienalytė, galinti pasireikšti odos pokyčiais, kvėpavimo sutrikimais ir kitais simptomais [2, 3]. Priklausomai nuo simptomų, patogeneizės mechanizmo ir fenotipo, atopija skirstoma į atopines ligas, iš kurių pagrindinės yra atopinis dermatitas (AD) ir alerginė astma (AA) [2, 3]. Apie 20

proc. pasaulio gyventojų serga atopinėmis ligomis, o didėjantis šių ligų paplitimas kelia naujų iššūkių mokslininkams bei sveikatos priežiūros specialistams [4]. Be to, vis aktualesne problema tampa ryškus atopinių ligų patogeneizės ir etiologijos nevienalytiškumas.

Genetiniai aspektai, aplinkos poveikis, imuninio atsako savitumai ir šių veiksnių tarpusavio sąveika yra vieni iš veiksnių, reikšmingų atopijos atsiradimui ir progresavimui [5, 6]. Tyrimų duomenys leidžia teigti, kad vitaminas D, gaunamas su maistu ir iš aplinkos,

veikiant saulės spinduliuotei, tikėtina, yra reikšmingas imuninio atsako reguliavime [7]. Vis dėlto svarbu atsižvelgti ir į genetinius veiksnius. Naujausi tyrimai rodo, kad su vitamino D apykaita susiję vitamino D receptoriaus (VDR) ir vitamino D surišančio baltymo (GC, taip pat žinomo kaip VDBP) genų vieno nukleotido polimorfizmas (VNP) gali būti reikšmingas atopijos patogenezėje [8–10].

Manoma, kad vitaminas D yra susijęs su imuninio atsako pobūdžiu atopijos metu, nes dalyvauja reguliuojant T limfocitų pagalbininkų (Th) dauginimąsi ir diferenciaciją bei veikia citokinų sintezės procesus [7]. Vis dėlto skirtingoms klinikinėms atopijos išraiškoms gali būti būdingi skirtingi imunologiniai mechanizmai, kurie nėra visiškai išaiškinti. Be to, VDR geno VNP gali būti reikšmingi vitamino D prisijungimui prie ląstelių ir jo veikimo organizme veiksmingumui, o skirtingos GC geno variacijos gali būti susijusios su vitamino D ir transportuojančio baltymo sąveika [8, 11]. Visa tai ypač svarbu vertinant vitamino D kiekį ir jo reikšmę imuninio atsako reguliavime. Atlikta metaanalizė parodė, kad tam tikri VDR geno polimorfizmai gali būti susiję su didesniu jautrumu alerginėms ligoms [12]. Tyrimai taip pat atskleidė VDR ir GC genų skirtingų genetinių variacijų sąsajas su IgE [13, 14] ir eozinofilų [15, 16] kiekių pokyčiais atopijos metu. Atsižvelgiant į tokius tyrimų rezultatus, galima daryti prielaidą apie reikšmingą VDR ir GC genų polimorfizmo reikšmę imuninio atsako reguliavime atopijos metu. Vis tik duomenų, leidžiančių vienareikšmiškai pagrįsti šią hipotezę, nepakanka.

Svarbu išsamiau ištirti VDR bei GC genų VNP reikšmę imuniniame atsake dalyvaujančių komponentų raiškai, nes tai padėtų geriau suprasti atopijos vystymosi eigą, atopinių ligų patogenezę, nustatyti galimus atopiją provokuojančius veiksnius. Tokie tyrimai galėtų prisidėti prie individualizuoto gydymo vitamino D papildais ir sprendžiant didėjančio vitamino D stygiaus problemą.

Tyrimo tikslas – nustatyti vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmo reikšmę imuniniam atsakui atopijos metu.

Tyrimo uždaviniai:

1. Ištirti vitamino D kiekį sergančiųjų atopinėmis ligomis grupėje ir palyginti su kontrolinės grupės duomenimis.
2. Nustatyti vitamino D receptoriaus geno ir vitamino D surišančio baltymo geno polimorfizmus bei įvertinti jų ryšį su vitamino D kiekiu esant (nesant) atopijai.
3. Nustatyti imuninių žymenų (bendro IgE, kraujo eozinofilų, T limfocitų ir būdingų citokinų) kiekių atopijos metu ir įvertinti jų ryšį su vitaminu D.
4. Įvertinti imuninių žymenų profilį atsižvelgiant į vitamino D receptoriaus bei vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmo variantus.

Tyrimo naujumas

Šis tyrimas yra vertingas indėlis siekiant geriau suprasti genetinių mechanizmų reikšmę atopinių ligų patogenezėje, pabrėžiant daugialypę vitamino D funkciją imuninio atsako moduliavime. VDR ir GC genų polimorfizmo nustatymas ir jų įtakos imuniniam atsakui vertinimas atopijos kontekste gali tapti naujų atopinių ligų diagnostikos metodų pagrindu ir sudaryti prielaidas taikyti individualizuotas intervencijas pagal genetinį profilį. Be to, tai pirmasis tyrimas, kuriame analizuojama VDR ir GC genų VNP reikšmė imuniniam atsakui atopijos metu Lietuvos populiacijoje. Tikimasi, kad šis tyrimas atvers naujus horizontus būsiamiems šios srities tyrimams.

METODAI

Tyrimas vykdytas 2020–2024 m. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto (LSMU) Medicinos akademijos (MA) Imunologijos ir alergologijos klinikoje, gavus Regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimą Nr. BE-2-74.

Dalis tyrimo duomenų buvo surinkti vykdant tarptautinį projektą „Vitamino D ir jo receptorių genų polimorfizmų palyginamasis tyrimas tarp Lietuvos, Latvijos ir Taivano vaikų ir suaugusiųjų, sergančių atopiniu dermatitu ir astma“.

Atliktą tyrimą iš dalies finansavo Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Mokslo fondas ir Lietuvos mokslo taryba (projekto reg. Nr. P-LLT-20-4).

Pirmame tyrimo etape visiems tiriamiesiems nustatytas vitamino D kiekis, VDR ir GC genų VNP bei bendro IgE ir eozinofilų kiekis kraujyje.

Antrame tyrimo etape, suformavus proporcingas grupes, daliai tiriamųjų įvertintas T limfocitų ir jiems būdingų citokinų profilis.

Tyrimo imtis

Sergančiųjų atopinėmis ligomis grupę sudarė 185 pacientai: 100 sergančiųjų lengvu arba vidutinio sunkumo atopiniu dermatitu, 85 – lengva arba vidutinio sunkumo alergine astma. AD diagnozė nustatyta vadovaujantis Hanifino ir Rajkos kriterijais [17], kai ligos sunkumas vertintas naudojant SCORAD (angl. *SCORing Atopic Dermatitis*) indeksą. AA sergantys asmenys buvo diagnozuojami ir klasifikuojami pagal Visuotinės astmos iniciatyvos (angl. *Global Initiative for Asthma*, GINA) rekomendacijas [18]. Įsijautrinimas alergenams nustatytas pagal EAACI rekomendacijas [19]. Kontrolinę grupę sudarė 81 asmuo, kuris nebuvo įsijautrinęs alergenams, nesirgo atopinėmis arba kitomis ligomis, galinčiomis paveikti tyrimo rezultatus. Visi tiriamieji nuo 2020 m. rugsėjo iki 2023 m. balandžio mėn. buvo tirti ir konsultuoti Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų Imunologijos ir alergologijos klinikoje.

Bendrieji įtraukimo kriterijai:

- vyresni nei 18 metų asmenys,
- mažiausiai 3 mėn. nevartojantys vitamino D papildų,
- nesergantys ūminėmis arba lėtinėmis kvėpavimo takų ligomis (išskyrus astmą),
- nesergantys sisteminėmis autoimuninėmis arba piktybinėmis ligomis.

Bendrieji atmetimo kriterijai:

- jaunesni nei 18 metų asmenys,
- gydymas alergenų imunoterapija,
- nėštumas.

Visi asmenys, sutikę dalyvauti tyrime, supažindinti su mokslinio tyrimo protokolu bei pasirašė informuoto asmens formą.

Mėginių rinkimas ir saugojimas

Mėginiai tyrimams surinkti atliekant venos punkciją. Bendro kraujo vertinimui bei VDR ir GC genų VNP nustatyti kraujas paimtas į mėgintuvėlius su K₂EDTA; genetiniams tyrimams skirti mėginiai buvo užšaldyti –80 °C temperatūroje iki tyrimo atlikimo. Citokinių, bendrojo IgE ir vitamino D kiekiui nustatyti kraujas surinktas į mėgintuvėlius be priedų, jie centrifuguoti 3500 aps./min. greičiu 10 min., o serumas atskirtas ir užšaldytas –80 °C temperatūroje iki laboratorinių tyrimų atlikimo. T limfocitų profilio analizei kraujas surinktas į mėgintuvėlius su ličio heparinu be gelio; tyrimai atlikti nešaldant.

Vitamino D ir bendro IgE kiekio serume vertinimas

Vitamino D kiekis tiriamųjų kraujyje nustatytas išmatavus 25(OH)D kiekį serume imunofermentinės analizės (angl. *enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA) metodu pagal standartizuotą gamintojo metodiką, naudojant komercinius reagentų rinkinius („BioVendor“, Brno, Čekija). Tyrimo jautrumas – 2,81 ng/ml. Remiantis gamintojo rekomendacijomis, Tarptautinės endokrinologų draugijos gairėmis [20, 21] ir literatūros šaltiniais [22, 23], duomenų analizė atlikta atsižvelgiant į vitamino D kiekį: stygius – iki 20 ng/ml, nepakankamumas – 20–30 ng/ml, normalus – 30–50 ng/ml.

Bendro IgE kiekio serume matavimai atlikti ELISA metodu, naudojant komercinį rinkinį („IBL International“, Hamburgas, Vokietija). Tyrimo jautrumas – 0,8 kU/l [24].

Genų vieno nukleotido polimorfizmo nustatymas

VDR ir GC genų VNP analizei iš tiriamųjų periferinio kraujo išskirta DNR, naudojant „QIAamp“ DNR kraujo mini rinkinį („Qiagen“, Hildenas, Vokietija) ir vadovaujantis gamintojo pateiktomis instrukcijomis. Naudojant „TaqMan“ vieno nukleotidų genotipavimo tyrimo zondus („Thermo Fisher Scientific“, San Diego,

JAV), išanalizuoti šeši pavienių nukleotidų polimorfizmai VDR gene ir keturi GC gene. Dėl genetinės variacijos, tiriamieji gali natūraliai neturėti kai kurių genų polimorfizmą, todėl rezultatų vertinimas atliktas atsižvelgiant į polimorfizmą pasireiškimą. Tyrimai atlikti LSMU MA Genetikos ir molekulinės medicinos klinikoje.

Uždegimą skatinančių ir slopinančių citokinių vertinimas

Citokinių matavimai serume atlikti ELISA metodu, naudojant komercinius rinkinius („Elabscience Biotechnology Inc.“, Hiustonas, JAV) su „Euroimmun Analyzer I“ (Liubekas, Vokietija).

Tyrimų matavimų jautrumas: IL-5 – 9,3 ng/ml, IFN-γ – 9,38 ng/ml, IL-17A – 18,75 ng/ml, IL-10 – 0,94 ng/ml, TGF-β1 – 0,1 ng/ml, IL-35 – 9,38 ng/ml, IL-33 – 9,38 ng/ml. Reakcijos intensyvumas matuotas spektrofotometriškai, kai bangos ilgis buvo 450 nm ± 2 nm.

T limfocitų potipių analizė

Th1, Th2, Th17 limfocitams vertinti, naudojant aukšto tankio gradientą („Ficoll Paque™“, „Amersham Biosciences AB“, Upsala, Švedija) išskirtos periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės (PBMC), kurios aktyvuotos, fiksuotos ir permabilizuotos naudojant komercinius reagentų rinkinius („BD Biosciences“, San Diego, JAV) bei nudažytos su fluorochromu žymėjais monokloniniais antikūnais: anti-CD4-PerCP-Cy5.5, anti-IL-17A-PE, IFN-γ-APC, IL-4 APC („Biosciences“, San Diego, JAV).

Treg limfocitai išskirti atliekant ląstelių lizavimą, fiksavimą ir permabilizavimą naudojant komercinius reagentų rinkinius („BD Biosciences“, San Diego, JAV). Ląstelės nudažytos fluorochromais žymėjais monokloniniais antikūnais: anti-CD4-FITC, anti-CD25-APC, anti-FoxP3-PE („BD Biosciences“, San Diego, JAV).

Paruoštų mėginių analizė atlikta tėkmės citometrijos analizatoriumi „BD FACSLyric™“ („BD Biosciences“, San Diego, JAV), naudojant „BD FACSuite™“ programą v1.2.1 („BD Biosciences“, San Diego, JAV).

Statistinė analizė

Duomenims analizuoti naudotos statistinės analizės „IBM SPSS Statistics“ 29 versija („IBM“, JAV) ir „Microsoft Excel 2017“ („Microsoft corporation“, JAV) programos. Kiekybinių duomenų pasiskirstymo pagal normalųjį dėsnį prielaida buvo tikrinama naudojant Šapiro-Vilko testą. Kategoriniams duomenims vertinti taikytas chi kvadrato (χ^2) kriterijus, esant mažai imčiai – tikslusis Fišerio testas. Dviejų grupių intervalinių kintamųjų vidurkių skirtumai palyginti atsižvelgiant į Stjudento t kriterijų; jei netenkinta skirstinių normalumo prielaida – Mano-Vitnio U kriterijų. Trijų grupių vidurkiai ir jų dispersijos lygintos

Disertacijos

naudojant vienfaktorinę dispersinę analizę (ANOVA). Jei netenkinta kintamųjų normalumo prielaida – neparametrinis Kruskalio-Voliso testas. Šansų santykis (ŠS) apskaičiuotas pagal alelių ir haplotipų dažnį su 95 proc. pasikliautinuoju intervalu (95 proc. PI) VDR ir GC geno polimorfizmui. Atliekant daugybinius palyginimus, pasirinkta netaikyti korekcijos dėl santykinai nedidelio imties dydžio ir antros rūšies klaidos tikimybės. Tiesiniams ryšiams tarp kiekybinių kintamųjų nustatyti apskaičiuoti Spirmeno koreliacijos koeficientai (r). Pasirinktas statistinio reikšmingumo lygmuo (p) – $\alpha = 0,05$; rezultatai laikyti statistiškai reikšmingais, kai p nesiekė 0,05.

REZULTATAI

Klinikiniai ir demografiniai duomenys

Iš viso į tyrimą įtraukti 266 tiriamieji: 100 sergantys vidutinio sunkumo arba lengvos formos atopiniu dermatitu, 85 – vidutinio sunkumo arba lengva alergine astma, o 81 asmuo sudarė kontrolinę grupę. Tirtų asmenų pagrindiniai klinikiniai ir demografiniai duomenys pateikiami 1 lentelėje. Sergantiems atopinėmis ligomis nustatyti didesni kraujo eozinofilų, bendro IgE ir mažesni vitamino D kiekiai, palyginti su kontroline grupe.

Įvertinus vitamino D stygiaus (iki 20 ng/ml), nepakankamumo (20–30 ng/ml) ir normalaus kiekio (30–50 ng/ml arba daugiau) pasiskirstymą tiriamųjų grupėse, atopinių ligų grupėje (AD su AA) vitamino D stygius buvo nustatytas reikšmingai dažniau, palyginti su kontroline grupe (46,6 proc. ir 38,3 proc., $p < 0,001$).

Nustatytų genų polimorfizmas ir vitaminas D

Siekiant išsiaiškinti VDR ir GC genų VNP sąsajas su atopija ir vitaminu D, tiriamieji suskirstyti į atopinę ($n = 185$) ir kontrolinę ($n = 81$) grupes. Atopinę grupę sudarė AD ir AA sergantys tiriamieji.

1 lentelė. Pagrindinės tiriamųjų charakteristikos

	Atopinis dermatitas (n = 100)	Alerginė astma (n = 85)	Kontrolė (n = 81)
Vyrai ir moterys, n	31 ir 69	30 ir 55	32 ir 49
Amžius, metai	29,51 ± 1,00	40,36 ± 1,50	35,57 ± 1,45
Bendras IgE, kU/l	919,83 ± 213 **	692,72 ± 170 *	24,99 ± 5,7
Vitaminas D, ng/ml	24,11 ± 0,94 ^{af}	18,37 ± 0,83**	27,23 ± 1,21
Periferinio kraujo ląstelės:			
Leukocitai × 10 ⁹ /l	6,48 ± 0,16	6,38 ± 0,16	6,26 ± 0,14
Limfocitai × 10 ⁹ /l	1,89 ± 0,05	1,82 ± 0,06	1,91 ± 0,04
Eozinofilai, 10 ⁹ /l	0,40 ± 0,04 **	0,33 ± 0,06 **	0,06 ± 0,01
Neutrofilai × 10 ⁹ /l	3,85 ± 0,13	3,76 ± 0,15	3,84 ± 0,12
Bazofilai × 10 ⁹ /l	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Monocitai × 10 ⁹ /l	0,59 ± 0,08	0,49 ± 0,02	0,45 ± 0,01

Duomenys pateikiami nurodant vidurkį ± standartinę vidurkio paklaidą (SEM) ir atvejų skaičių (n), jei nenurodyta kitaip. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$, palyginti atopinių ligų ir kontrolinę grupes. ^f $p < 0,05$, palyginti atopinio dermatito ir alerginės astmos grupes. IgE – imunoglobulinas E.

Įvertinus VDR geno VNP pasiskirstymą tirtose grupėse, atsižvelgiant į vitamino D kiekį, nustatyta, kad reikšmingai dažnesnis rs3847987 genotipo CC (63,5 proc., palyginti su 27,8 proc.) ir retesnis rs3847987 genotipo AC (34,9 proc., palyginti su 72,2 proc.) pasiskirstymas būdingas sudariusiems kontrolinę grupę, kai nustatytas sumažėjęs vitamino D kiekis, palyginti su tais, kuriems nustatytas normalus vitamino D kiekis. Reikšmingų VDR geno VNP pasiskirstymo sergančiųjų atopinėmis ligomis grupėje nenustatyta.

Įvertinus GC geno VNP pasiskirstymą tirtose grupėse, atsižvelgiant į vitamino D kiekį, dažnesnis rs4588 genotipo GG (67,6 proc., palyginti su 49,0 proc.) ir retesnis genotipo GT (18,9 proc., palyginti su 37,2 proc.) pasiskirstymas aptiktas atopijos grupėje, kai nustatytas normalus vitamino D kiekis, nei tada, kai nustatytas sumažėjęs vitamino D kiekis.

Taikant logistinės regresijos analizės modelį, įvertintos tirtų VDR ir GC genų polimorfizmų sąsajos su normalaus vitamino D kiekio tikimybe (daugiau nei 30 ng/ml) atopijos ir kontrolinėje grupėse; reikšmingi rezultatai pateikiami 2 lentelėje. Kontrolinėje grupėje nustatyta didesnė normalaus vitamino D kiekio tikimybė, jei tiriamiesiems nustatytas rs731236 GG genotipas, rs2228570 GG genotipas, rs3847987 AA, AC genotipai ir alelis A, palyginti su kitais šių polimorfizmų genotipais ir alelio nebuvimu (2 lentelė). Be to, kontrolinėje grupėje nustatyta reikšmingai mažesnė normalaus vitamino D kiekio tikimybė, jei tiriamieji buvo rs2228570 alelio A nešiotojai, palyginti su tų, kurie neturėjo šio alelio, duomenimis (2 lentelė).

Atopinėmis ligomis sergantiems asmenims, turintiems VDR VNP rs11168293 genotipą GG, normalaus vitamino D kiekio tikimybė buvo mažesnė nei turintiems GT genotipą (2 lentelė).

Vertinant GC geno VNP, nustatyta, kad atopijos grupėje VNP rs4588 alelio T variantas buvo reikšmingai susijęs su mažesne normalaus vitamino D kiekio kraujyje tikimybe, palyginti su tų, kurie šio alelio neturėjo, duomenimis (2 lentelė).

T limfocitų profilis ir jiems būdingų citokinų kiekis

T limfocitų potipių, dalyvaujančių uždegimo reguliavime, kiekiai bei jų santykis tiriamųjų grupėse pateikiami 3 lentelėje. AD ir AA grupėse nustatytas reikšmingai didesnis Th1, Th2, Th17 ir mažesnis Treg limfocitų kiekis, palyginti su kontroline grupe. Atopinių ligų grupėse nustatytas mažesnis Th17 ir Treg limfocitų santykis, palyginti su kontroline grupe.

Uždegimą skatinančių ir slopinančių citokinų kiekių vertinimas pateikiamas 4 lentelėje. AD ir AA grupėse nustatyti reikšmingai didesni IL-5 ir IL-17A ir TGF- β 1 kiekiai, palyginti su kontroline grupe. AD ir AA grupėse nustatytas mažesnis IL-10 ir kiekis, palyginti su kontroline grupe.

Sąsajos tarp imuninių žymenų

Nustatytas silpnai teigiamas ryšys tarp bendro IgE kiekio ir Treg limfocitų, IL-5 bei TGF-β1 kiekio atopijos metu (5 lentelė). IgE kiekio padidėjimas buvo susijęs su eozinofilų padidėjimu kraujyje. Nustatytas silpnas neigiamas ryšys tarp eozinofilų skaičiaus ir Th1 bei vitamino D kiekio. Nustatytas teigiamas ryšys tarp eozino-

filų ir IL-5 kiekio. Vitamino D kiekis buvo neigiamai susijęs su Th1, Th2, Th17, IL-5 ir teigiamai su IL-33.

Genų polimorfizmas, bendro IgE kiekis ir kraujo eozinofilų kiekis atopijos metu

Atopijos metu, nustatčius rs7041 genotipą CC, aptikti didesni kraujo eozinofilų kiekiai, palyginti su tais,

2 lentelė. Reikšmingi vitamino D receptoriaus geno, vitamino D surišančio baltymo geno polimorfizmų ir normalaus vitamino D kiekio (daugiau nei 30 ng/ml) tikimybė sergančiųjų atopinėmis ligomis (n = 185) ir sveikų tiriamųjų (n = 81) grupėse

VNP	Genotipai ir aleliai	Grupė	ŠS	95 proc. PI
VDR				
rs731236 (Taql) A > G	GG, palyginti su AA	Atopija	1,683	0,947–2,993
		Kontrolė	4,037	1,117–14,588*
	AG, palyginti su AA	Atopija	1,889	0,470–7,587
		Kontrolė	2,182	0,957–4,976
	G alelio nešiotojai, palyginti su neturinčiais G alelio	Atopija	1,706	0,748–3,893
		Kontrolė	2,024	0,519–7,898
	A alelio nešiotojai, palyginti su neturinčiais A alelio	Atopija	0,462	0,171–1,243
		Kontrolė	1,350	0,318–5,726
rs2228570 (FokI) G > A	GG, palyginti su AA	Atopija	0,821	0,481–1,399
		Kontrolė	2,092	1,044–4,194*
	GG, palyginti su AG	Atopija	1,448	0,343–6,108
		Kontrolė	7,137	2,025–25,145*
	G alelio nešiotojai, palyginti su neturinčiais G alelio	Atopija	0,695	0,328–1,475
		Kontrolė	2,159	0,559–8,340
	A alelio nešiotojai, palyginti su neturinčiais A alelio	Atopija	1,206	0,459–3,168
		Kontrolė	0,229	0,069–0,761*
rs3847987 C > A	AA, palyginti su CC	Atopija	1,017	0,332–3,117
		Kontrolė	35,997	6,401–202,446*
	AC, palyginti su CC	Atopija	1,093	0,516–2,315
		Kontrolė	4,727	1,489–15,007*
	C alelio nešiotojai, palyginti su neturinčiais C alelio	Atopija	1,000	0,108–9,221
		Kontrolė	1,253	0,286–2,264
	A alelio nešiotojai, palyginti su neturinčiais A alelio	Atopija	1,089	0,522–2,270
		Kontrolė	4,522	1,429–14,308*
rs11168293 G > T	GG, palyginti su TT	Atopija	1,509	0,543–4,189
		Kontrolė	1,138	0,578–2,243
	GG, palyginti su GT	Atopija	0,425	0,185–0,977*
		Kontrolė	1,969	0,696–5,525
	G alelio nešiotojai, palyginti su neturinčiais G alelio	Atopija	1,050	0,396–2,782
		Kontrolė	3,596	0,432–29,933
	T alelio nešiotojai, palyginti su neturinčiais T alelio	Atopija	0,491	0,237–1,018
		Kontrolė	1,179	0,404–3,439
GC				
rs4588 (Thr420Lys) G > T	GG, palyginti su TT	Atopija	0,843	0,491–1,447
		Kontrolė	0,711	0,323–1,565
	GT, palyginti su TT	Atopija	1,929	0,549–6,779
		Kontrolė	1,156	0,509–4,467
	G alelio nešiotojai, palyginti su neturinčiais G alelio	Atopija	1,024	0,357–2,938
		Kontrolė	1,093	0,740–5,877
	T alelio nešiotojai, palyginti su neturinčiais T alelio	Atopija	0,461	0,215–0,986*
		Kontrolė	0,349	0,111–1,098

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas; ŠS – šansų santykis; PI – pasiskliautinis intervalas. NS – nereikšminga statistiškai; p < 0,05.

3 lentelė. T limfocitų potipių, dalyvaujančių uždegimo aktyvinime (Th2, Th17) ir uždegimo slopinime (Th1, Treg), kiekiai bei jų santykis tiriamųjų grupėse

T limfocitų populiacija, proc. nuo PBMC	Atopinis dermatitas (n = 32)	Alerginė astma (n = 29)	Kontrolė (n = 25)
Th1 (CD4 ⁺ IFN-γ ⁺)	5,78 ± 0,61*	5,88 ± 0,82*	3,39 ± 0,56
Th2 (CD4 ⁺ IL-4 ⁺)	1,51 ± 0,25**	1,60 ± 0,85**	0,57 ± 0,09
Th17 (CD4 ⁺ IL-17-A ⁺)	0,53 ± 0,25*	0,58 ± 0,13*	0,25 ± 0,04
Treg (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺)	0,48 ± 0,03**	0,41 ± 0,02**	0,65 ± 0,04
Th1 ir Th2 santykis	4,62 ± 0,68	4,88 ± 0,56	6,58 ± 0,66
Th17 ir Treg santykis	1,63 ± 0,33*	1,20 ± 0,13*	2,19 ± 0,31

PBMC – periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės. *p < 0,05, palyginti atopinių ligų ir kontrolinę grupes; **p < 0,001, palyginti atopinių ligų ir kontrolinę grupes.

4 lentelė. Uždegimą skatinančių (IL-5, IL-17A, IL-33) ir uždegimą slopinančių (TGF-β1, IL-10, IFN-γ, IL-35) citokinų kiekiai tiriamųjų grupėse

Citokinai	Atopinis dermatitas (n = 98)	Alerginė astma (n = 43)	Kontrolė (n = 34)
IL-5, pg/ml	110,8 ± 8,55**	104,1 ± 12,20**	46,9 ± 5,32
IL-17A, pg/ml	31,0 ± 2,81*	32,82 ± 5,56*	14,3 ± 1,34
TGF-β1, ng/ml	18,8 ± 0,07*	18,2 ± 0,12**	12,9 ± 0,09
IL-10, pg/ml	15,48 ± 0,87**	19,28 ± 1,18*	25,10 ± 2,41
	n = 36	n = 29	n = 21
IFN-γ, pg/ml	0,74 ± 0,19	0,81 ± 0,29	0,71 ± 0,22
IL-35, pg/ml	13,26 ± 1,56	15,18 ± 3,51	11,12 ± 0,44
IL-33, pg/ml	103,15 ± 31,21	81,76 ± 16,20	36,21 ± 10,64

*p < 0,05, palyginti atopinių ligų ir kontrolinę grupes; **p < 0,001, palyginti atopinių ligų ir kontrolinę grupes. IL – interleukinas; IFN – interferonas; TGF – transformuojantis augimo veiksnys.

5 lentelė. Reikšmingas ryšys tarp T limfocitų potipių, jiems būdingų citokinų ir bendro IgE, kraujo eozinofilų bei vitamino D kiekio atopijos metu

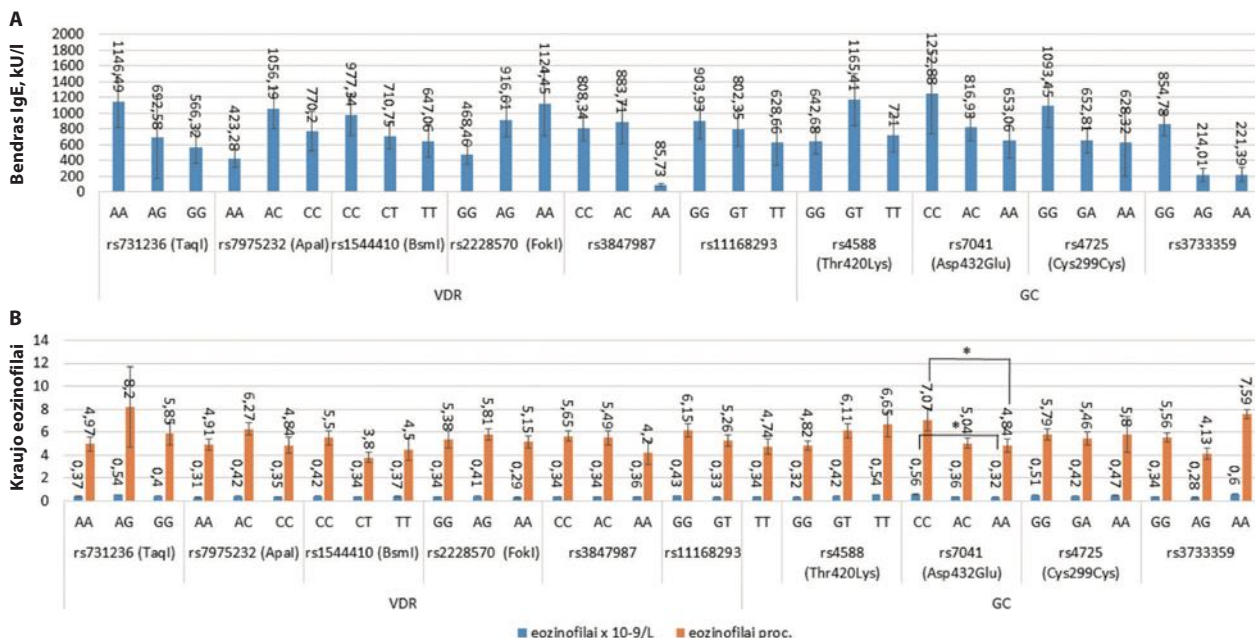
	IgE (U/ml)	Eozinofilai (x10 ⁹ /l)	Vitaminas D (ng/ml)
IgE, U/ml	–	0,31**	0,08
Eozinofilai, x10 ⁹ /l	0,31**	–	–0,18*
Vitaminas D, ng/ml	0,08	–0,18*	–
Th1, proc. nuo PBMC	–0,09	–0,25*	–0,25*
Th2, proc. nuo PBMC	0,04	–0,05	–0,29*
Th17, proc. nuo PBMC	–0,08	–0,20	–0,21*
Treg, proc. nuo PBMC	0,21*	0,12	–0,03
IL-5, pg/ml	0,29*	0,30*	–0,32*
TGF-β1, ng/ml	0,25*	0,05	–0,08
IL-33, pg/ml	0,06	–0,05	0,31*

PBMC – periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės. *p < 0,05, palyginti atopinių ligų ir kontrolinę grupes; **p < 0,001, palyginti atopinių ligų ir kontrolinę grupes. IgE – imunoglobulinas E; IL – interleukinas; TGF – transformuojantis augimo veiksnys.

Disertacijos

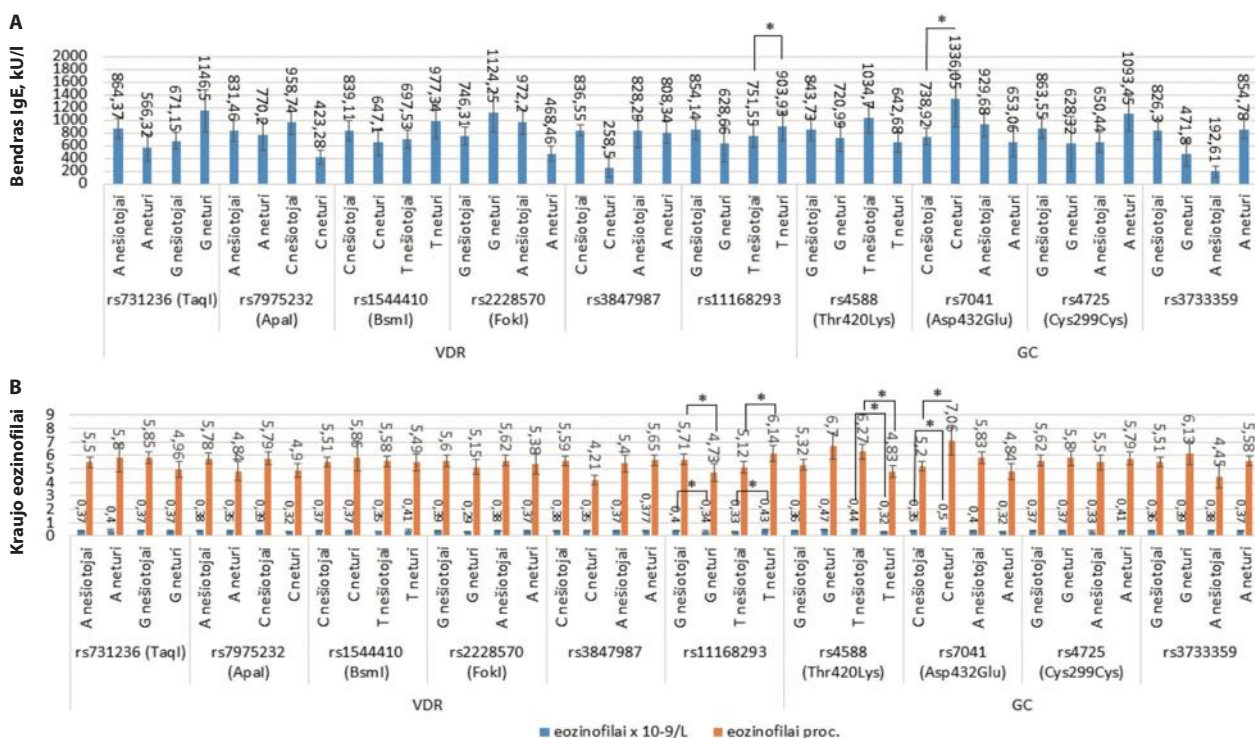
kuriems nustatytas šio VNP AA genotipas (1 pav.). Rs741 alelio C nešiotojams nustatytas didesnis kraujo eozinofilų ir bendro IgE kiekis, o rs4588 T alelio nešiotojams – didesnis kraujo eozinofilų kiekis, palyginti su tais, kurie šių alelių neturėjo (2 pav.).

Atopijos grupėje rs11168293 alelio T nešiotojams aptiktas mažesnis bendro IgE ir kraujo eozinofilų kiekis, rs11168293 alelio G nešiotojams – didesnis kraujo eozinofilų kiekis, palyginti su tais, kurie neturėjo šių alelių (2 pav.).



1 pav. Bendro IgE (A), kraujo eozinofilų (B) kiekio pasiskirstymas atopijos metu, atsižvelgiant į vitamino D receptoriaus ir vitaminą D surišančio baltymo genų polimorfizmų genotipus (n = 185)

VDR – vitamino D receptoriaus genas; GC – vitaminą D surišančio baltymo genas. Duomenys pateikiami nurodant vidurkį. * p < 0,05, palyginti VDR arba GC genų polimorfizmų genotipus.



2 pav. Bendro IgE (A), kraujo eozinofilų (B) kiekio pasiskirstymas atopijos metu, atsižvelgiant į vitamino D receptoriaus ir vitaminą D surišančio baltymo genų polimorfizmų alelius (n = 185)

VDR – vitamino D receptoriaus genas; GC – vitaminą D surišančio baltymo genas. Duomenys pateikiami nurodant vidurkį. * p < 0,05, palyginti VDR arba GC genų polimorfizmų alelius.

Genų polimorfizmas ir T limfocitų bei jiems būdingų citokinų kiekis atopijos metu

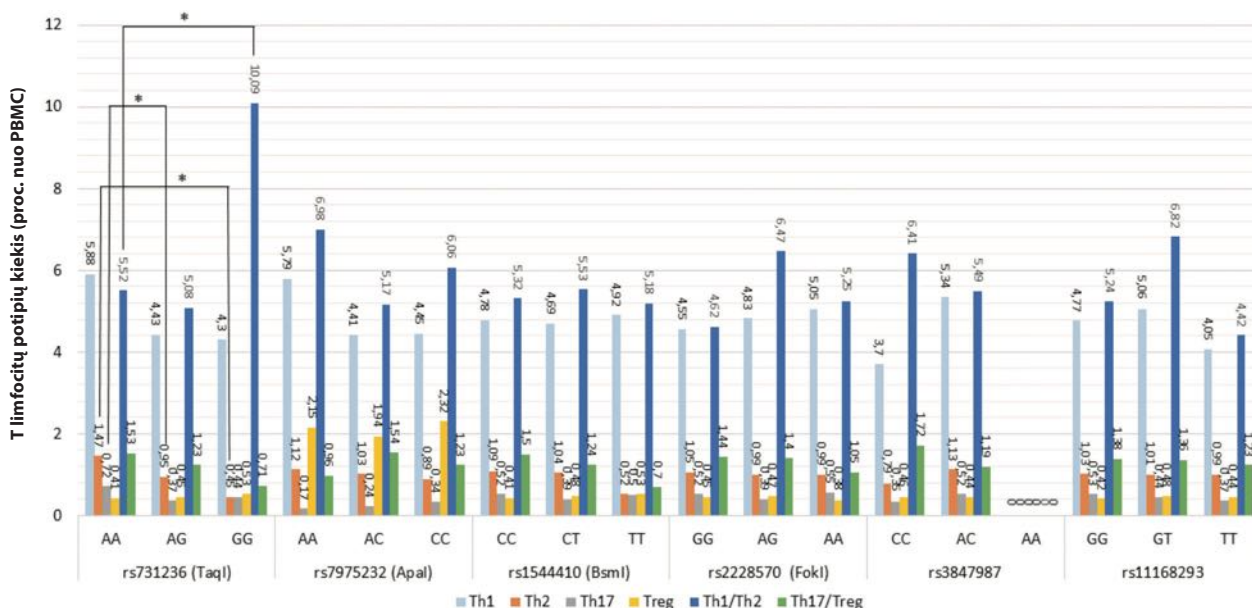
T limfocitų populiacijų ir jiems būdingų citokinų kiekio pasiskirstymas atopijos metu, atsižvelgiant į nustatytus VDR geno VNP, pateikiamas 3 ir 4 pav. Nustatyta, kad VDR geno VNP rs731236 genotipo AA nešiotojams nustatyti didesni Th2, Th17 kiekiai bei mažesnis Th1 ir Th2 santykis, palyginti su turinčiais šio VNP genotipus AG ir GG (3 pav.).

Rs731236 genotipo GG nešiotojams nustatyti mažesni IL-10 kiekiai nei turint kitus šio polimorfizmo genotipus (4 pav.). Be to, rs731236 genotipas AA nešiotojams nustatyti mažesni TGF-β1 kiekiai, nei

turint šio VNP genotipą AG. Didesni IL-10 kiekiai nustatyti turint rs11168293 genotipą TT, palyginti su kitais rs11168293 genotipais.

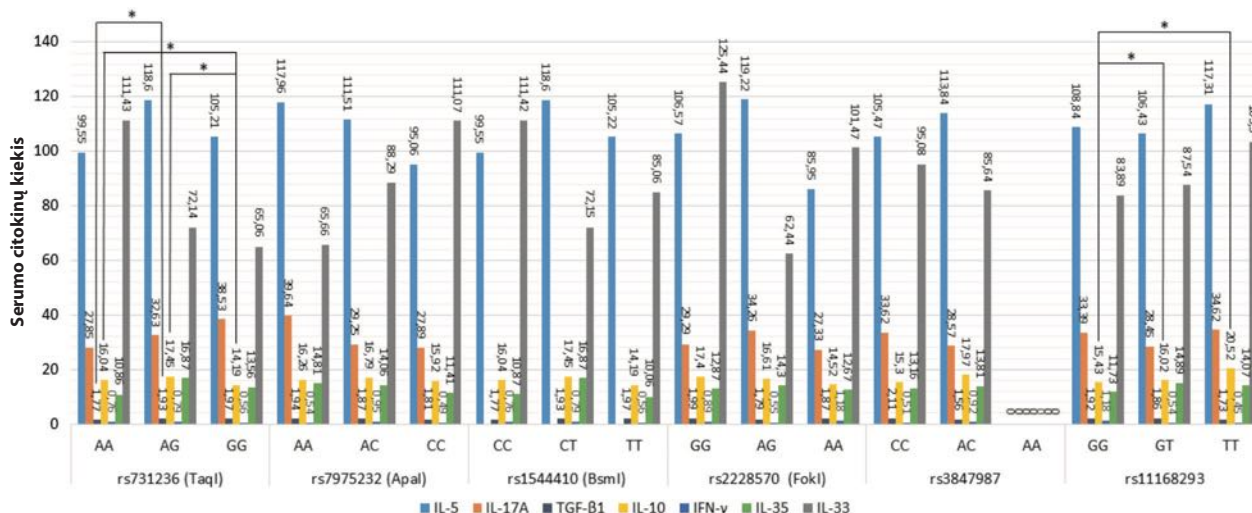
Sergantieji atopinėmis ligomis, kuriems nustatytas GC geno VNP rs4588 genotipas GG, pasižymėjo mažesniais Th2 kiekiais, palyginti su tais, kuriems nustatytas GT genotipas (5 pav.). Be to, rs4588 genotipo GG nešiotojams nustatytas mažesnis Th17 kiekis, palyginti su tais, kuriems nustatytas rs4588 TT genotipas. Rs7041 genotipo CC nešiotojams nustatyti didesni Th2 ir Th17 kiekiai, nei turint kitus šio VNP genotipus.

Tiriamieji, kuriems nustatytas rs4588 TT genotipas, pasižymėjo reikšmingai mažesniais TGF-β1 kiekiais



3 pav. T limfocitų potipių kiekis atopijos metu, atsižvelgiant į vitamino D receptoriaus geno polimorfizmus (n = 61)

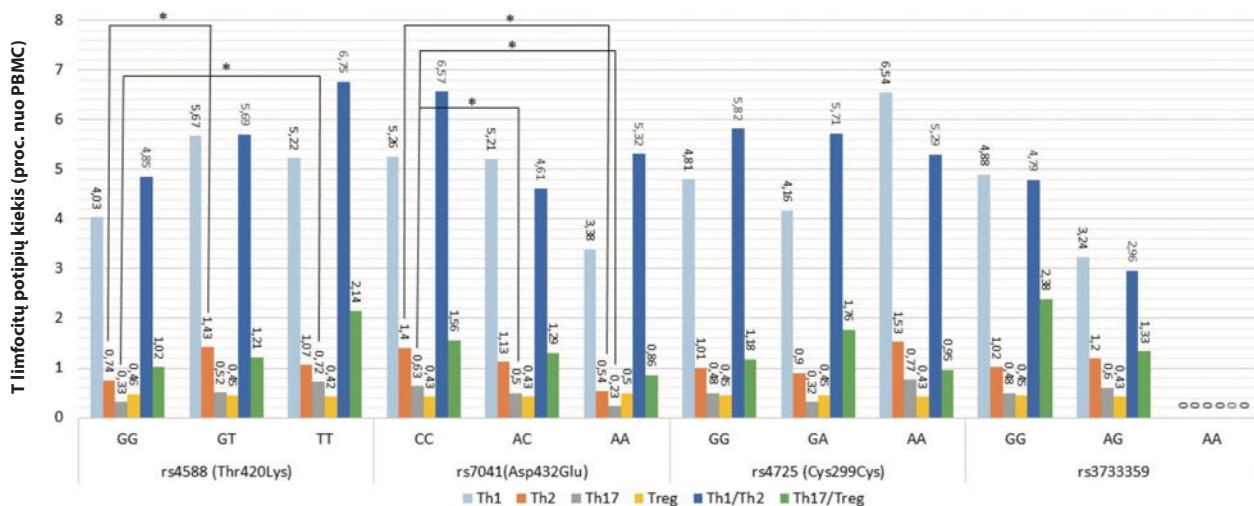
Duomenys pateikiami nurodant vidurkį, kai limfocitų populiacijų kiekis išreikštas procentais nuo periferinio kraujo mononuklearinių ląstelių skaičiaus. PBMC – periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės. * p < 0,05, palyginti vitamino D receptoriaus geno polimorfizmų genotipus.



4 pav. Uždegimą reguliuojančių citokinų IL-5, IL-17A, TGF-β1, IL-10 (n = 141) ir IFN-γ, IL-35, IL-33 (n = 65) kiekis atopijos metu, atsižvelgiant į vitamino D receptoriaus geno polimorfizmus

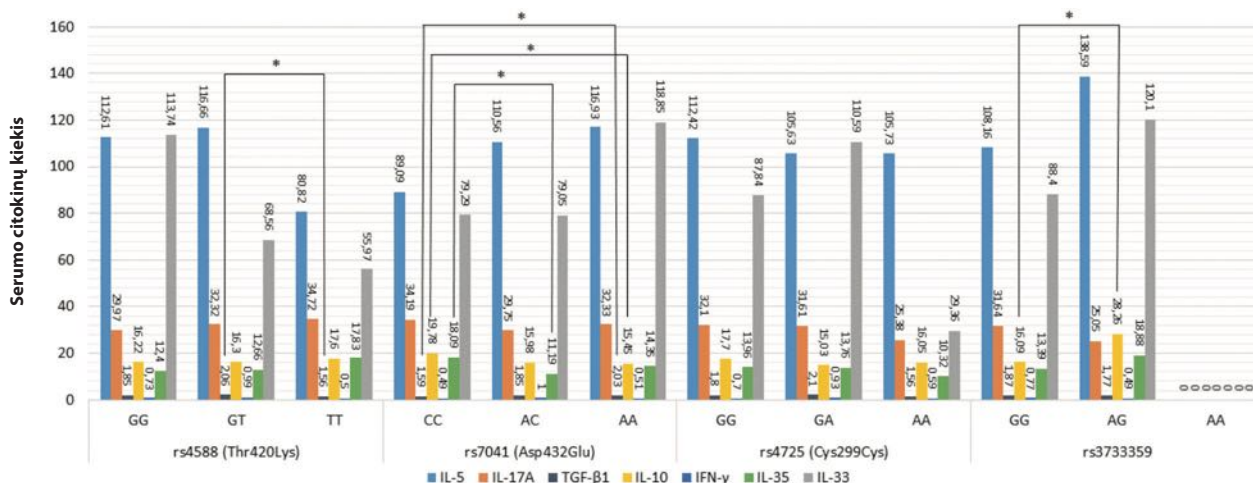
Duomenys pateikiami nurodant vidurkį, kai citokinų kiekis serume išreikštas pg/ml, TGF-β1 ng/ml.

* p < 0,05, palyginti vitamino D receptoriaus geno polimorfizmų genotipus.



5 pav. T limfocitų potiųjų kiekis atopijos metu, atsižvelgiant į vitaminą D surišančio baltymo geno polimorfizmus (n = 61)

Duomenys pateikiami nurodant vidurkį, kai limfocitų populiacijų kiekis išreikštas procentais nuo periferinio kraujo mononuklearinių ląstelių skaičiaus. PBMC – periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės. * p < 0,05, palyginti vitaminą D surišančio baltymo geno polimorfizmų genotipus.



6 pav. Uždegimą reguliuojančių citokinų IL-5, IL-17A, TGF-β1, IL-10 (n = 141) ir IFN-γ, IL-35, IL-33 (n = 65) kiekis atopijos metu, atsižvelgiant į vitaminą D surišančio baltymo geno polimorfizmus

Duomenys pateikiami nurodant vidurkį, kai citokinų kiekis serume išreikštas pg/ml, TGF-β1 ng/ml. * p < 0,05, palyginti vitaminą D surišančio baltymo geno polimorfizmų genotipus.

serume, palyginti su turinčiaisiais GT genotipą (6 pav.). Tiems, kuriems nustatytas rs7041 CC, nustatyti mažesni TGF-β1 ir didesni IL-10 kiekiai, nei tiems, kuriems aptiktas rs7041 AA genotipas. Rs7041 CC genotipas buvo susijęs su didesniais IL-35 rodikliais. Tiriamesiems, kuriems nustatytas rs3733359 GG, buvo nustatyti reikšmingai mažesni IL-10 kiekiai, palyginti su turinčiaisiais AG genotipą.

IŠVADOS

1. Sergančiųjų atopinėmis ligomis (atopiniu dermatitu ir alergine astma) grupėje nustatytas mažesnis vitamino D kiekis kraujyje nei kontrolinėje (sveikų asmenų) grupėje, atitinkamai – $21,42 \pm 0,67$ ir $27,23 \pm 1,21$, p < 0,05.
2. Ištyrus šešis vitamino D receptoriaus geno ir keturis vitaminą D surišančio baltymo geno polimorfizmus nustatyta:

- Vitamino D receptoriaus geno rs11168293 GG genotipas, palyginti su GT genotipu, ir vitaminą D surišančio baltymo geno rs4588 T alelio turėjimas susiję su mažesne normalaus vitamino D kiekio tikimybe sergančiųjų atopinėmis ligomis grupėje, atitinkamai – ŠS – 0,425, 95 proc. PI – 0,185–0,977 ir ŠS – 0,461, 95 proc. PI – 0,215–0,986.
- Sveikų asmenų grupėje vitamino D receptoriaus geno rs731236 GG genotipas, palyginti su AA genotipu, ir rs3847987 alelio A turėjimas susiję su didesne normalaus vitamino D kiekio tikimybe, atitinkamai – ŠS – 4,037, 95 proc. PI – 1,117–14,588 ir ŠS – 4,522, 95 proc. PI – 1,429–14,308, o rs2228570 A alelio turėjimas susijęs su mažesne normalaus vitamino D kiekio tikimybe (ŠS – 0,229, 95 proc. PI – 0,069–0,761).

3. Nustatytas sergančiųjų atopinėmis ligomis imuninio atsako pobūdį iliustruojančių žymenų profilis: reikšmingai padidėję bendro IgE, kraujo eozinofilų, Th1, Th2, Th17, IL-5, IL-17A, TGF-β1 ir sumažėję Treg, IL-10 kiekiai kraujyje. Vitamino D kiekis atopijos metu buvo netiesiogiai susijęs su uždegimo žymenimis (Th2, Th17, IL-5 ir eozinofilų kiekiu kraujyje).
4. Vertinant tirtų imuninių žymenų kiekį, atsižvelgiant į tirtų genų polimorfizmą variantus, nustatyta:
 - Esant vitamino D receptoriaus geno polimorfizmo rs11168293 aleliui G arba vitaminą D surišančio baltymo geno polimorfizmą rs4588 aleliui T ir rs7041 aleliui C nustatytas padidėjęs eozinofilų bei IgE kiekis.
 - Esant vitamino D receptoriaus geno polimorfizmo rs731236 genotipui AA nustatytas padidėjęs Th2 ir Th17 limfocitų kiekis, o turint rs731236 ar rs11168293 genotipą GG nustatytas sumažėjęs IL-10 kiekis kraujyje.
 - Esant vitaminą D surišančio baltymo geno polimorfizmo rs4588 genotipui GG nustatytas sumažėjęs Th2 ir Th17 kiekis, o rs7041 genotipui CC – padidėjęs Th2, Th17, IL-10, IL-35 ir sumažėjęs TGF-β1 kiekis kraujyje.

Klinikinis reikšmingumas

Tyrimo rezultatai rodo, kad atopijos metu tikslinga tirti vitamino D kiekį ir prireikus skirti jo papildus. Šio vitamino vartojimas kartu su kitais imunomoduliuojančiais vaistais gali būti reikšmingas siekiant veiksmingiau reguliuoti imuninį uždegimą atopijos metu.

Skirtingi GC ir VDR genų variantai gali turėti įtakos vitamino D kiekiui. Asmenims, kurie yra tam tikrų genų variantų nešiotojai arba, priešingai, neturi tam tikrų šių genų variantų, gali prireikti didesnių vitamino D dozių arba dažnesnio papildų vartojimo, kad būtų pasiektas terapinis poveikis. Atsižvelgiant į VDR ir GC genų polimorfizmą bei vitamino D kiekį, individualizuotas vitamino D dozavimas galėtų būti naudingas kontroliuojant atopines ligas.

Gauti rezultatai leidžia teigti, kad genų polimorfizmas gali būti svarbus žymuo prognozuojant atopinių ligų riziką bei parenkant individualizuotą gydymą, kartu optimizuojant vitamino D vartojimą ir uždegiminio proceso kontrolę.

STRAIPSNIAI, KURIUOSE PASKELBTI

DISERTACIJOS REZULTATAI

1. Bastyte D, Tamasauskienė L, Stakaitienė I, Briedė K, Ugenskiene R, Valiukeviciene S, Gradauskienė B. Relation of T cell profile with vitamin D receptor and vitamin D-binding protein gene polymorphisms in atopy. *Int J Mol Sci*. 2024;25(16):9021.
2. Bastyte D, Tamasauskienė L, Stakaitienė I, Ugenskiene R, Gradauskienė Sitkauskienė B. The association of vitamin D receptor gene polymorphisms with vitamin D, total IgE,

and blood eosinophils in patients with atopy. *Biomolecules*. 2024;14(2):212.

3. Bastyte D, Tamasauskienė L, Golubickaite I, Ugenskiene R, Sitkauskienė B. Vitamin D receptor and vitamin D binding protein gene polymorphisms in patients with asthma: a pilot study. *BMC Pulm Med*. 2023;23(1):245.

LITERATŪRA

1. Kumar S, Jeong Y, Ashraf MU, Bae YS. Dendritic cell-mediated Th2 immunity and immune disorders. *IJMS*. 2019;20(9):2159.
2. Koszorú K, Borza J, Gulácsi L, Sárdy M. Quality of life in patients with atopic dermatitis. *Cutis*. 2019;104(3):174–7.
3. Cosmi L, Maggi L, Mazzoni A, Liotta F, Annunziato F. Biologicals targeting type 2 immunity: Lessons learned from asthma, chronic urticaria and atopic dermatitis. *European Journal of Immunology*. 2019;49(9):1334–43.
4. Dierick BJH, van der Molen T, Flokstra-de Blok BMJ, Muraro A, Postma MJ, Kocks JWH, et al. Burden and socioeconomics of asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis and food allergy. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. 2020;20(5):437–53.
5. Tamasauskienė L, Golubickaite I, Ugenskiene R, Sjakste N, Paramonova N, Wu LSH, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms in atopy. *Immun Inflamm Dis*. 2021;9(4):1153–9.
6. Haarala AK, Sinikumpu SP, Jokelainen J, Pekkanen J, Huilaja L. Associative factors for atopic dermatitis and other atopic diseases in middle-aged adults: a population-based birth cohort study among 5373 subjects. *Health Science Reports*. 2022;6(1):e1015.
7. Batmaz SB, Arıkoğlu T, Tamer L, Eskandari G, Kuyucu S. Seasonal variation of asthma control, lung function tests and allergic inflammation in relation to vitamin D levels: a prospective annual study. *Postepy Dermatol Alergol*. 2018;35(1):99–105.
8. Munkhbayarlakh S, Kao HF, Hou YI, Tuvshintur N, Bayar-Ulzii B, Narantsetseg L, et al. Vitamin D plasma concentration and vitamin D receptor genetic variants confer risk of asthma: a comparison study of Taiwanese and Mongolian populations. *World Allergy Organ J*. 2019;12(11):100076.
9. Filiou A, Hoyer A, Holmdahl I, Chakraborty S, van Hage M, Nordlund B, et al. Vitamin D receptor genetic variant associated with asthma in Swedish school-children. *Clinical & Experimental Allergy*. 2023;53(10):1045–9.
10. Shafi T, Farooq I, Bhat IA, Rasool R, Sameem F, Rashid I, et al. Delineating the relationship of Vitamin D binding protein (VDBP) genetic variants in exon 11 with serum Vitamin D levels in Atopic Dermatitis. *Human Gene*. 2023;36:201178.
11. Ju F, Zhu R. Association of vitamin D levels and VDR variant (rs2228570) with allergic rhinitis: A meta-analysis and trial sequential analysis. *Heliyon*. 2023;9(6):e17283.
12. Zhang L, Zhang S, He C, Wang X. VDR Gene Polymorphisms and Allergic Diseases: Evidence from a Meta-analysis. *Immunol Invest*. 2020;49(1–2):166–77.
13. Wjst M, Altmüller J, Faus-Kessler T, Braig C, Bahnweg M, André E. Asthma families show transmission disequilibrium of gene variants in the vitamin D metabolism and signalling pathway. *Respir Res*. 2006;7(1):60.
14. Ahmed AE, Hassan MH, Toghan R, Rashwan NI. Analysis of 25-hydroxy cholecalciferol, immunoglobulin E, and vitamin D receptor single nucleotide polymorphisms (Apa1, Taq1, and Bsm1), among sample of Egyptian children with bronchial asthma: a case-control study. *Pediatr Pulmonol*. 2020;55(6):1349–58.
15. Hiraguchi Y, Tanida H, Sugimoto M, Hosoki K, Nagao M, Tokuda R, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 upregulates functional C-X-C chemokine receptor type 4 expression in human eosinophils. *IAA*. 2012;158(1):51–7.
16. Fawzy MS, Elgazzaz MG, Ibrahim A, Hussein MH, Khashana MS, Toraih EA. Association of group-specific component exon 11 polymorphisms with bronchial asthma in children and adolescents. *Scand J Immunol*. 2019;89(3):e12740.
17. Böhm M, Svensson Å, Kull I, Wahlgren CF. Hanifin's and Rajka's minor criteria for atopic dermatitis: which do 2-year-olds exhibit? *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2000;43(5):785–92.

18. **Levy ML, Bacharier LB, Bateman E, Boulet LP, Brightling C, Buhl R, et al.** Key recommendations for primary care from the 2022 Global Initiative for Asthma (GINA) update. *npj Prim Care Respir Med.* 2023;33(1):1–13.
19. **Jutel M, Agache I, Zemelka-Wiacek M, Akdis M, Chivato T, Gracia IE, et al.** Nomenclature of allergic diseases and hypersensitivity reactions: adapted to modern needs: An EAACI position paper. *Allergy.* 2023;78(11):2851–74.
20. **Chun RF, Lauridsen AL, Suon L, Zella LA, Pike JW, Modlin RL, et al.** Vitamin D-binding protein directs monocyte responses to 25-hydroxy- and 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(7):3368–76.
21. **Demay MB, Pittas AG, Bikle DD, Diab DL, Kiely ME, Lazaretti-Castro M, et al.** Vitamin D for the prevention of disease: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2024;109(8):1907–47.
22. **Huang F, Ju YH, Wang HB, Li YN.** Maternal vitamin D deficiency impairs Treg and Breg responses in offspring mice and deteriorates allergic airway inflammation. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2020;16:89.
23. **Zacharioudaki M, Messaritakis I, Galanakis E.** Vitamin D receptor, vitamin D binding protein and CYP27B1 single nucleotide polymorphisms and susceptibility to viral infections in infants. *Sci Rep.* 2021;11:13835
24. **Wittig HJ, Belloit J, De Fillippi I, Royal G.** Age-related serum immunoglobulin E levels in healthy subjects and in patients with allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 1980;66(4):305–13.