

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Daina Bastytė

**IMUNINIS ATSAKAS ATOPIJOS METU:
VITAMINO D RECEPTORIAUS IR
VITAMINĄ D SURIŠANČIO BALTYMO
GENŲ POLIMORFIZMAS**

Daktaro disertacija
Gamtos mokslai,
biologija (N 010)

Kaunas, 2025

Disertacija rengta 2020–2024 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos fakulteto Imunologijos ir alergologijos klinikoje.

Mokslinė vadovė

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

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Biologijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

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

Nariai:

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).

Disertacija bus ginama viešajame Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2025 m. vasario 21 d. 12 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Mokomojo laboratorinio korpuso prof. K. Oželio auditorijoje.

Adresas: Eivenių g. 4, LT-50161 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

Daina Bastytė

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

Doctoral Dissertation
Natural Sciences,
Biology (N 010)

Kaunas, 2025

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.

Scientific Supervisor

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

The Dissertation is defended at the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences:

Chairperson

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

Members:

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);

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

Dissertation will be defended at the open session of the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on February 21st, 2025, at 12 PM in the Prof. K. Oželis Auditorium of the Lithuanian University of Health Sciences.

Address: Eivenių st. 4, LT-50161 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	9
Tikslas	10
Uždaviniai	10
Tyrimo naujumas	11
Klinikinis reikšmingumas.....	11
Autoriaus indėlis.....	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Atopinių ligų samprata, epidemiologija ir genetiniai veiksniai.....	13
1.2. Atopinių ligų patogenezė.....	14
1.2.1. Atopinis dermatitas	15
1.2.2. Alerginė astma	17
1.3. Imuninio atsako komponentai	18
1.3.1. 1-o ir 2-o tipo T limfocitai	18
1.3.2. 17-o tipo T limfocitai.....	20
1.3.3. T reguliaciniai limfocitai	22
1.3.4. Uždegimą skatinantys ir slopinantys citokinai	24
1.4. Vitaminas D	28
1.4.1. Vitamino D apykaita	28
1.4.2. Vitamino D trūkumas.....	29
1.4.3. Vitaminas D ir imunitetas	30
1.5. Vieno nukleotido polimorfizmas	34
1.5.1. Vitamino D receptoriaus geno polimorfizmas	35
1.5.2. Vitaminą D surišančio baltymo geno polimorfizmas	37
2. METODAI	39
2.1. Tyrimo imtis	39
2.2. Mėginių rinkimas ir saugojimas	40
2.3. Periferinio kraujo vertinimas.....	40
2.4. Vitamino D ir bendro IgE koncentracijos serume vertinimas	40
2.5. Genų vieno nukleotido polimorfizmo nustatymas	41
2.6. Uždegimą skatinančių ir uždegimą slopinančių citokininų vertinimas.....	41
2.7. Imuninių ląstelių – T limfocitų potipių analizė	42
2.7.1. Mononuklearinių ląstelių išskyrimas iš periferinio kraujo	42
2.7.2. T limfocitų paruošimas	43
2.7.3. Limfocitų fenotipo vertinimas tėkmės citometrijos metodu.....	45
2.8. Imties dydis ir statistinė analizė	50
3. REZULTATAI.....	51
3.1. Klinikiniai ir demografiniai duomenys	51
3.2. Vitamino D kiekis, atsižvelgiant į atopijos klinikinį pobūdį	52
3.3. Nustatytų vitamino D receptoriaus ir vitaminą D surišančio baltymo genų polimorfizmų pasiskirstymas.....	52
3.4. Vitamino D receptoriaus ir vitaminą D surišančio baltymo genų polimorfizmas ir vitaminas D	54

3.5. Imuninio atsako pobūdis	60
3.5.1. T limfocitų profilis ir jiems būdingų citokinų kiekis.....	60
3.5.2. Sąsajos tarp imuninių žymenų.....	61
3.6. Vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmas ir imuninis atsakas.....	64
3.6.1. Genų polimorfizmas, bendro IgE kiekis ir kraujo eozinofilų kiekis atopijos metu	64
3.6.2. Genų polimorfizmas ir T limfocitų populiacijų bei jiems būdingų citokinių kiekis atopijos metu.....	67
4. REZULTATŲ APTARIMAS	73
4.1. Vitamino D kiekis.....	73
4.2. Vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmas ir vitaminas D.....	74
4.3. Imuninis atsakas atopijos metu.....	77
4.4. Imuninis atsakas ir vitaminas D	79
4.5. Vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmas ir bendro IgE, kraujo eozinofilų kiekis atopijos metu.....	81
4.6. Vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmas ir T limfocitų potipių bei jiems būdingų citokinų kiekis atopijos metu.....	83
IŠVADOS.....	86
TYRIMO APRIBOJIMAI	87
SUMMARY	88
LITERATŪROS SĄRAŠAS	122
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	139
PRIEDAI.....	143
CURRICULUM VITAE	151
PADĖKA.....	153

SANTRUMPOS

AA	– alerginė astma
AD	– atopinis dermatitas
Apal	– žymuo naudojamas aptikti <i>VDR</i> geno vieno nukleotido polimorfizmą rs7975232
APL	– antigeną pateikiančios ląstelės (angl. <i>antigen-presenting cells</i>)
rs7041	– vieno nukleotido polimorfizmas, koduojantis Asp432Glu amino rūgšties pokytį <i>GC</i> gene
BsmI	– žymuo naudojamas aptikti <i>VDR</i> geno vieno nukleotido polimorfizmą rs1544410
CD4+	– CD4 antigeną išskiriančios ląstelės – T limfocitai pagalbininkai
rs4725	– vieno nukleotido polimorfizmas, koduojantis Cys299Cys amino rūgšties pokytį <i>GC</i> gene
D2	– ergokalciferolis
D3	– cholekalciferolis
EAACI	– Europos alergijos ir klinikinės imunologijos draugija (angl. <i>European Academy of Allergy & Clinical Immunology</i>)
ELISA	– imunosorbentinė analizė (angl. <i>enzyme – linked immunosorbent assay</i>)
FEV1	– forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę
FGF23	– fibroblastų augimą reguliuojantis veiksnys 23 (angl. <i>fibroblast growth factor 23</i>)
FokI	– žymuo naudojamas aptikti <i>VDR</i> geno vieno nukleotido polimorfizmas rs2228570
Foxp3	– vidubranduolinis transkripcijos veiksnys (angl. <i>forkhead box protein P3, nuclear transcription factor</i>)
GC	– vitamną D surišantį baltymą koduojantis genas
GINA	– Pasaulinės astmos iniciatyva (angl. <i>Global Initiative for Asthma</i>)
GM-CSF	– granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantis veiksnys (angl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
Ig	– imunoglobulinas
IOM	– JAV medicinos institutas (angl. <i>institute of medicine</i>)
IL	– interleukinas
IL-1R	– IL-1 receptorius
IFN-γ	– interferonas γ

MAF	– minorinio alelio pasiskirstymas (angl. <i>minor allele frequency</i>)
MHC	– audinių suderinamumo kompleksas (angl. <i>major histocompatibility complex</i>)
DNR	– deoksiribonukleorūgštis
ODM	– odos dūrio mėginys
PSO	– pasaulio sveikatos organizacija
PTH	– parathormonas
RORγt	– su retinoinės rūgšties receptoriais susijęs receptorius γ t (angl. <i>RAR-related orphan receptor γt</i>)
RXR	– retinoidinis X receptorius
SCORAD	– atopinio dermatito eigos sunkumo laipsnis (angl. <i>SCORing Atopic Dermatitis</i>)
sIgE	– specifinis IgE
ST2	– IL-1 šeimos receptorius
TaqI	– žymuo naudojamas aptikti <i>VDR</i> geno vieno nukleotido polimorfizmą rs731236
TGF-β	– transformuojantis augimo veiksnys β (angl. <i>transforming growth factor β</i>)
Th	– T limfocitai pagalbininkai
rs4588	– vieno nukleotido polimorfizmas, koduojantis Thr420Lys amino rūgšties pokytį <i>GC</i> gene
TLR	– Toll-like receptorius
TNF-α	– navikų nekrozės veiksnys α (angl. <i>tumor necrosis factor α</i>)
Treg	– T reguliaciniai limfocitai
TSLP	– čiobrialiaukės stromos limfopoetinas (angl. <i>thymic stromal lymphopoietin</i>)
UV	– ultravioletinė spinduliuotė
VDR	– vitamino D receptorius (angl. <i>vitamin D receptor</i>)
<i>VDR</i>	– vitamino D receptorių koduojantis genas
VDBP	– vitamino D surišantis baltymas (angl. <i>vitamin D-binding protein</i>)
VDRE	– vitamino D atsako elementas
VNP	– vieno nukleotido polimorfizmas (angl. <i>single nucleotide polymorphism – SNP</i>)
7-DHC	– 7-dehidrocholesterolis
1,25(OH)2D	– 1,25-dihidroksivitaminas D
25(OH)D	– 25-hidroksivitaminas D

ĮVADAS

Atopija – tai genetiškai predisponuojantis sutrikimas, susijęs su alerginėmis reakcijomis, sukeltomis dėl suaktyvėjusio imunoglobulino E (IgE) atsako į aplinkos alergenų [1]. Tai yra sudėtinga, nevienalytė būklė, galinti pasireikšti varginančiu niežuliu, odos pakitimais, kvėpavimo sutrikimais ir kitais simptomais [2,3]. Priklausomai nuo simptomų, patogenezės mechanizmo ir fenotipo, atopija skirstoma į atopines ligas, iš kurių pagrindinės yra atopinis dermatitas (AD) ir alerginė astma (AA) [2,3]. Svarbu tai, kad atopijos paplitimas per pastaruosius kelis dešimtmečius itin sparčiai padidėjo [4]. Apie 20 proc. pasaulio gyventojų serga atopinėmis ligomis ir didėjantis šių ligų paplitimas kelia naujus iššūkius mokslininkams bei sveikatos priežiūros specialistams [4]. Be to, vis aktualesne problema tampa ryškus atopinių ligų patogenezės ir etiologijos nevienalytiškumas.

Genetiniai aspektai, aplinkos poveikis, imuninio atsako ypatybės 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, galimai atlieka svarbų vaidmenį imuninio atsako reguliavime [7]. Tačiau svarbu atsižvelgti ir į genetinius veiksnius, kurie tikėtina, yra reikšmingi atopinės būklės vystymuisi. Be to, naujausi tyrimai atskleidžia, 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 atlikti reikšmingą vaidmenį atopijos patogenezėje [8–10].

Manoma, kad vitaminas D yra susijęs su imuninio atsako pobūdžiu atopijos metu, nes prisideda reguliuojant T limfocitų pagalbininkų (Th) dauginimąsi ir diferenciaciją bei veikia citokinų sintezės procesus [7]. Įprastai atopijos patogenezei būdingas aktyvus 2-o tipo T limfocitų pagalbininkų (Th2) atsakas [3,11]. Tačiau įvairioms klinikinėms atopijos išraiškoms gali būti būdingi skirtingi imunologiniai mechanizmai, kurie nėra visiškai išaiškinti. Naujausių tyrimų rezultatai atskleidžia, kad atopinių ligų patogenezėje reikšmingą vaidmenį gali atlikti ne tik Th2 limfocitai, bet ir kiti T limfocitų potipiai, tokie kaip Th17 ir T reguliaciniai (Treg) limfocitai [3,12,13]. Atsižvelgiant į tokius duomenis galima teigti, kad Th17 tipo limfocitai ir jų išskiriami citokinai aktyviai dalyvauja skatinant uždegiminius procesus kartu su Th2 limfocitais, o Treg limfocitai bei jiems būdingi citokinai yra reikšmingi slopinant imuninį uždegimą [12,14,15]. Todėl vertinant imuninį atsaką atopijos metu ir siekiant patikslinti atopijos patogenezėje veikiančių mechanizmų pobūdį, svarbu atkreipti dėmesį ne tik Th2, bet ir kitus T limfocitų potipius bei jų funkcinį aktyvumą, vertinant išskiriamus citokinus.

Mokslininkų tyrimai patvirtina, kad imuninio atsako metu vitaminas D palaiko Th1/Th2 pusiausvyrą, slopina Th17 limfocitų atsaką ir stimuliuoja Treg limfocitų veikimą, taip slopindamas imuninį uždegimą [16–19]. *VDR* geno VNP gali būti reikšmingi vitamino D prisijungimui prie ląstelių ir jo veikimo organizme efektyvumui, o skirtingos *GC* geno variacijos gali būti susijusios su vitamino D susirišimu su transportuojančiu baltymu [8,20]; tai ypač svarbu vertinant vitamino D kiekį ir jo vaidmenį imuninio atsako reguliavime. Be to, atlikta meta-analizė atskleidė, kad tam tikri *VDR* geno polimorfizmai gali būti susiję su didesniu jautrumu alerginėms ligoms [21]. Tyrimai taip pat atskleidė *VDR* ir *GC* genų skirtingų genetinių variacijų sąsajas su IgE [22,23] ir eozinofilų [24,25] kiekių kitimais atopijos metu. Atsižvelgiant į tokius tyrimų rezultatus galima daryti prielaidą apie reikšmingą *VDR* ir *GC* genų polimorfizmo vaidmenį imuninio atsako reguliavime atopijos metu. Tačiau duomenų, leidžiančių vienareikšmiškai pagrįsti šią hipotezę, nepakanka, o uždegimo reguliavime dalyvaujančių imuninio atsako mechanizmų ryšys su vitamino D kiekiu kraujyje bei *VDR* ir *GC* genų skirtingomis genetinėmis variacijomis nėra visiškai išaiškintas.

Siekiant pagerinti atopinių ligų kontrolę, svarbu detaliam išaiškinti *VDR* bei *GC* genų vieno nukleotido polimorfizmo reikšmę imuniniame atsake dalyvaujančių komponentų raiškai. Tai padėtų detaliam suprasti atopijos vystymosi eigą ir atopinių ligų patogenezę bei nustatyti galimus atopiją provokuojančius veiksnius. Be to, *VDR* ir *GC* genų VNP reikšmės imuniniam atsakui atopijos metu įvertinimas galėtų prisidėti individualizuojant gydymą vitamino D papildais ir sprendžiant vis didėjančio vitamino D trūkumo paplitimo problemas.

Tikslas

Nustatyti vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmo reikšmę imuniniam atsakui atopijos metu.

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 ir įvertinti jų ryšį su vitamino D kiekiu esant/nesant atopijai.
3. Nustatyti imuninių žymenų (bendro IgE, kraujo eozinofilų, T limfocitų ir būdingų citokinų) kiekį 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 polimorfizmą variantus.

Tyrimo naujumas

Atopinėms ligoms, būdingas sudėtingas imuninis atsakas, apimantis įvairius T limfocitų potipius ir jiems būdingus citokinus [3,12]. Be to, imuninio atsako pobūdis gali būti susijęs su genetiniais ir aplinkos aspektais [6] bei vitaminu D [7]. Daroma prielaida, kad vitamino D veikimui ir imuninio atsako raiškai atopijos metu yra svarbus vitamino D metabolizme dalyvaujančių vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genų vieno nukleotido polimorfizmas [8,20]. Vis dėlto, nėra pakankamai duomenų, kad būtų galima vienareikšmiškai pagrįsti hipotezę apie šių genų polimorfizmo reikšmę imuniniam atsakui atopijos metu.

Šio tyrimo metu atliktas išsamus vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmo tyrimas pacientams, sergantiems atopinėmis ligomis (AD ar AA), ir kontrolinei tiriamųjų grupei. Tai – vertingas indėlis siekiant suprasti genetinių mechanizmų vaidmenį atopinių ligų patogenezėje, pabrėžiant daugialypį vitamino D vaidmenį imuninio atsako moduliavime. *VDR* ir *GC* genų polimorfizmo nustatymas ir reikšmės imuniniam atsakui įvertinimas atopijos kontekste atveria galimybes personalizuotai medicinai. Tai gali būti naujų atopinių ligų diagnostikos metodų pagrindas ir suteikti galimybę pritaikyti intervencijas pagal asmens genetinį profilį. Be to, tai yra pirmasis tyrimas, analizuojantis *VDR* ir *GC* genų vieno nukleotido polimorfizmo reikšmę imuniniam atsakui atopijos metu Lietuvos populiacijoje. Tikimasi, kad šis tyrimas atvers naujus horizontus būsimiems šios srities tyrimams.

Klinikinis reikšmingumas

Tyrimo rezultatai suteikia išsamesnių duomenų apie vitamino D vaidmenį imuninio atsako reguliavime atopijos metu. Tai parodo, kad sergantiesiems atopinėmis ligomis yra tikslinga tirti vitamino D kiekį kraujyje ir esant poreikiui skirti jo papildų vartojimą. Šio vitamino vartojimas kartu su kitais imunomoduliuojančiais vaistais gali būti reikšmingas siekiant veiksmingiau reguliuoti imuninį uždegimą atopijos metu.

Gauti rezultatai atskleidžia reikšmingą *VDR* ir *GC* genų polimorfizmo vaidmenį reguliuojant vitamino D kiekį. Nustatyta, kad tam tikri genų variantai buvo susiję su sumažėjusiu vitamino D kiekiu atopinėmis ligomis sergantiems asmenims, o kiti – labiau būdingi esant normaliam vitamino D kiekiui. Tokie duomenys rodo, kad skirtingi *GC* ir *VDR* genų variantai gali turėti įta-

kos 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, individualiai pritaikytas vitamino D dozavimas galėtų būti naudingas kontroliuojant atopines ligas ir prisidėti sprendžiant vis didėjančio vitamino D trūkumo paplitimo problemas.

Tyrimo rezultatai suteikia naujų žinių apie *VDR* ir *GC* genų polimorfizmo reikšmę imuniniam atsakui atopijos metu. Gauti rezultatai rodo, kad genų polimorfizmas atlieka tam tikrą vaidmenį imuninio atsako pasireiškinge, todėl gali būti naudojami kaip žymuo vertinant atopinių ligų fenotipus, kurių identifikavimas svarbus parenkant individualizuotą gydymą. Atlikto tyrimo rezultatai taip pat gali prisidėti prognozuojant atopinių ligų išsivystymo riziką, ypatingą dėmesį skiriant pacientų genetiniam profiliui bei būti naudingi siekiant optimizuoti vitamino D vartojimą ir uždegiminio proceso kontrolę.

Autoriaus indėlis

Autorius aktyviai dalyvavo visose tyrimo stadijose, pradedant mokslinės literatūros analize ir baigiant laboratoriniais tyrimais bei gautų rezultatų apibendrinimu. Žemiau pateikiami autoriaus savarankiškai atlikti tyrimo etapai:

- Atlikta mokslinės literatūros analizė ir parengtas Kauno regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto protokolas.
- Parengti projektinių tyrimų projektai ir gautas finansavimas iš Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Mokslo fondo.
- Analizei paruošta tiriamoji medžiaga (kraujo ir serumo mėginiai), iš kurios atlikti laboratoriniai tyrimai: tėkmės citometrijos metodu (T limfocitų išskyrimas, paruošimas ir vertinimas), imunofermentinės analizės (ELISA) metodu (uždegimą skatinančių ir slopinančių citokinų kiekio nustatymas; IgE ir vitamino D kiekio nustatymas).
- Atlikta nustatytų genų polimorfizmų analizė ir gautų rezultatų interpretacija.
- Atlikta tyrimų rezultatų analizė ir apibendrinimas.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Atopinių ligų samprata, epidemiologija ir genetiniai veiksniai

Atopija – paveldėtas genetinis polinkis sirgti viena ar keliomis alerginių reakcijų sukeliama ligomis, tokiomis kaip atopinis dermatitas ir alerginė astma [1]. Atopinių ligų patogenezėi būdingas ryškus nevienalytiškumas, kuris pasireiškia skirtingais fenotipais ir endotipais, apibrėžiančiais atskirus ląstelinius ir molekulinis patogenezės mechanizmus [11,26,27]. Paprastai dėl reakcijos į specifinį alergeną pasireiškia imuninių ląstelių (limfocitų, eozinofilų, putliųjų ląstelių, dendritinių ląstelių, epidermio keratinocitų) padidinto jautrumo reakcijos [3,11]. Reaguojančios imuninės ląstelės aktyvina organizmo reakciją bei inicijuoja vietinio ir sisteminio uždegimo procesus, kurie gali apimti vieną ar kelis organus [3,11]. Svarbu tai, kad atopija ir jos sukeltos pasekmės gali būti susiję ne tik su imuninės sistemos aktyvumu, bet ir su mitybos, fizinio, socialinio aktyvumo įpročiais, emocine būkle, kasdienio gyvenimo ypatumais [2]. Reikšminga problema, priklausomai nuo atopinės ligos, gali tapti tokie atopijos raiškos padariniai kaip miego sutrikimai dėl nuolatinio intensyvaus niežėjimo ar sunkesnio kvėpavimo, darbingumo, fizinio bei socialinio aktyvumo sumažėjimas ar net psichinės būklės pablogėjimai [2].

Europos alergijos ir klinikinės imunologijos akademijos (EAACI) naujausių tyrimų duomenimis, atopinės ligos yra dažniausios lėtinės ligos Europoje ir ateityje jų paplitimas tik didės [28]. Šiomis ligomis serga maždaug 20 proc. pasaulio gyventojų [4]. Tokios atopinės ligos kaip AD yra viena labiausiai paplitusių odos ligų, žinoma, kad šia liga serga apie 15–20 proc. vaikų ir 1–3 proc. suaugusiųjų visame pasaulyje [29]. Europoje AD serga apie 4,4 proc. suaugusiųjų ir 18,6 proc. vaikų, 20 proc. visų atvejų sudaro sergantieji vidutinio sunkumo ar sunkia ligos forma [30]. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, tokiomis atopinėmis ligomis kaip astma serga apie 339 milijonai žmonių visame pasaulyje, kasdien dėl šios ligos miršta apie tūkstantis asmenų [31,32]. Europos Sąjungos šalyse astma serga 8,2 proc. suaugusiųjų [33]. Ypač didelis jos paplitimas pastebimas tankiai apgyvendintose vietovėse, išsivysčiusios pramonės šalyse, kur fiksuojama didesnė oro tarša [33]. Dėl didėjančio sergamumo atopinėmis ligomis patiriamos nemenkos finansinės išlaidos. Apskaičiuota, kad dėl sergamumo atopiniu dermatitu metinės visuomenės išlaidos visoje Europoje sudaro apie 30 milijardų eurų; 15,2 milijardo eurų išleidžiama dėl praleistų darbo dienų ar sumažėjusio darbo našumo, 10,1 milijardo eurų – tiesioginėms medicininėms išlaidoms ir 4,7 milijardo eurų – asmeninėms pacientų išlaidoms [30].

Atopija yra paveldima būklė, kurios išsivystymas – sudėtingas procesas, lemiamas tiek genetinių, tiek aplinkos veiksnių ir jų tarpusavio sąveikos [5,6].

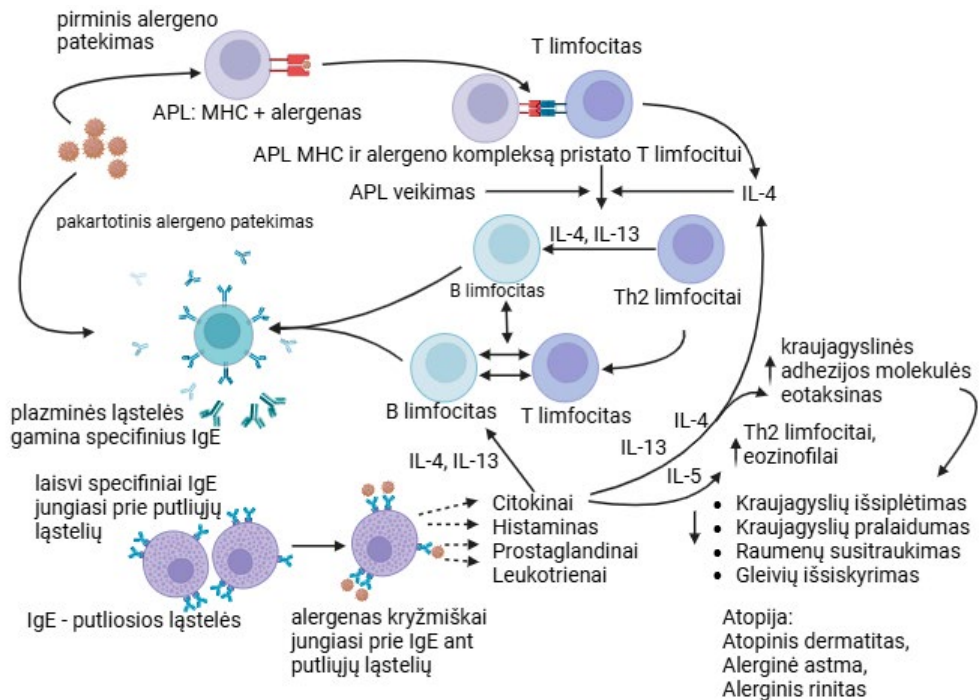
Aplinkos veiksniai, tokie kaip alergenų poveikis, oro tarša, mityba, vitamino D kiekis kraujyje ir žarnyno mikrobiotos sudėtis, vaidina svarbų vaidmenį atopijos vystymuisi [5,6]. Tačiau negalima pamiršti, kad genetinis polinkis yra vienas iš esminių predisponuojančių elementų, o imuninio atsako reguliavime dalyvaujančių genų variacijos gali būti reikšmingos atopijos patogenezėje.

Manoma, kad vitamino D trūkumas ar nepakankamumas yra susijęs su imuninio uždegimo aktyvumu ir prisideda prie atopinių ligų išsivystymo [7]. Be to, genetinės variacijos, susijusios su vitamino D veikimu ir imuninio atsako reguliavimu, gali būti ypač reikšmingos atopijos patogenezėje [8–10]. Tyrimai rodo, kad vitamino D metabolizme dalyvaujančių komponentų, tokių kaip vitamino D receptoriai [8–9] ar vitamino D surišančio baltymo [10], genetinės variacijos gali atlikti reikšmingą vaidmenį reguliuojant vitamino D veikimą. *VDR* genas koduoja receptorių, atsakingą už vitamino D patekimą į ląsteles, įskaitant imunines ląsteles [9]. Vitaminą D surišantis baltymas ir jį koduojantys genai yra atsakingi už vitamino D transportą kraujotakoje [10]. Vitamino D metabolizme dalyvaujančių komponentų genetinės variacijos gali būti susijusios su vitamino D kiekiu, atliekamomis funkcijomis bei organizmo atsaku į vitaminą [8–10]. Šių genų variacijos kartu su išoriniais veiksniais, tokiais kaip vitamino D nepakankamumas, gali skatinti lėtinį uždegimą ir atlikti reikšmingą vaidmenį imuninio atsako reguliavime. Tai yra svarbūs atopines ligas predisponuojantys veiksniai, galintys daryti įtaką tiek ligos išsivystymui, tiek jos eigai.

1.2. Atopinių ligų patogenezė

Atopija yra apibūdinama kaip organizmo imuninės sistemos reakcija į iš aplinkos patekusį alergeną, kai sukeliama jam specifinių IgE (sIgE) klasės antikūnų gamyba dėl 2-o tipo imuninio atsako (1.2.1 pav.). Alergenas, patekęs į organizmą, yra surišamas su MHC molekulėmis, esančiomis ant antigeną pateikiančių ląstelių (APL) paviršiaus, ir sudaro kompleksą [1]. T limfocitai atpažinę kompleksą, jungiasi prie jo ir po sąveikos su šiuo kompleksu diferencijuojasi į skirtingus T limfocitų pagalbininkų (Th) potipius [3]. Žinoma, kad atopijos metu būdingas aktyvus imuninis atsakas, dėl padidėjusios Th2 limfocitų diferenciacijos ir jų išskiriamų citokinų gamybos, dėl kurių yra skatinamas alergeno sukeltas uždegimas [34]. Th2 limfocitai ir jų gaminami citokinai, tokie kaip interleukinas (IL) 4, IL-5, IL-13, aktyvina B limfocitų diferenciaciją į plazmines ląsteles, kurios gamina sIgE prieš tam tikrą, iš aplinkos patekusį, alergeną, taip skatinant IgE sintezę ir aktyvinant reakciją į alergeno sukeltą uždegimą [34]. IgE molekulė paviršiuje turi Fc fragmentą, kuriuo prisijungia prie didelio afiniškumo FcεRI receptoriaus,

esantį putliųjų ląstelių, bazofilų, neutrofilų paviršiuje [35]. Pakartotinai į organizmą patekęs alergenas kryžmiškai jungiasi prie kitų ląstelių paviršiuje susidariusio IgE molekulės ir FcεRI receptoriaus komplekso [35]. Kai į organizmą patekęs alergenas prisijungia prie dviejų ar daugiau IgE molekulių yra aktyvuojamos ląstelės, prie kurių buvo prisijungusi IgE molekulė (putliosios ląstelės, bazofilai, eozinofilai) ir sukeliama jų degranuliacija [35]. Aktyvuotos ląstelės išskiria uždegimą skatinančius mediatorius (histaminą, leukotrienus, prostaglandinus ir kt.), kurie sukelia alerginę reakciją [11]. Išskirti mediatoriai patologiškai veikia kraujagyslių endotelį, kvėpavimo takų ir virškinamojo trakto lygiuosius raumenis, sukelia ląstelių infiltraciją imuninio uždegimo vietoje [35]. Imuninis atsakas ir jo metu veikiantys mechanizmai yra vieni pagrindinių veiksnių inicijuojant ir tęsiant alerginius atsakus atopijos metu. Šios alerginės reakcijos gali inicijuoti atopinių ligų išsivystymą, tokių kaip atopinis dermatitas ar alerginė astma.



1.2.1 pav. 2-o tipo imuninis atsakas (Pagal G.W. Volcheck [35])

1.2.1. Atopinis dermatitas

Atopinis dermatitas – lėtinė pasikartojanti uždegiminė odos liga, pasireiškianti ryškiu odos sausėjimu, intensyviu niežėjimu ir specifine išbėrimų lokalizacija (kūdikiams – galūnių tiesiamieji paviršiai; vyresniems – galūnių

lenkiamieji paviršiai) [36,37]. Tai yra nevienalytė liga, susijusi su įvairiais imuninės sistemos ir antimikrobinio barjero sutrikimais [36]. Dažniausiai AD diagnozuojamas vaikams; nepaisant to, ši liga gali pasireikšti ir suaugusiems [37]. Dažnai AD yra pirmasis atopijos pasireiškimas, susijęs su astmos ar (ir) alerginio rinito išsivystymu, todėl AD įvardijamas kaip „atopinio maršo“ pradžia [38,39]. Atlikti tyrimai atskleidžia, kad AD bei jo sunkumas gali būti pagrindinis rizikos veiksnys alerginio rinito, alerginės astmos ir specifinio įsijautrinimo alergenams pasireiškimui; tai pabrėžia epidermio barjero svarbą atopinių ligų patogenezėje [40].

AD skirstomas į išorinį (alerginį) ir vidinį (nealerginį) tipus [41–43]. Tarp sergančiųjų AD labiausiai paplitęs alerginis ligos tipas (70–80 proc. sergančiųjų), jo metu kraujyje nustatomi dideli bendro IgE bei sIgE kiekiai prieš aplinkos ir maisto alergenų [44]. Vidinio arba nealerginio AD metu gali būti nustatomas nepadidėjęs IgE ir sIgE kiekis [44]. Šio AD tipo dažnis yra apie 20–30 proc. sergančiųjų AD [44]. Ankstyvo AD metu IgE sukeltas alerginis įsijautrinimas dažnai nėra nustatomas iš karto po pažeidimo, tačiau pasireiškia praėjus kelioms savaitėms ar mėnesiams [44]. Todėl negalima atmesti, kad su IgE nesusijusi forma gali būti su IgE susijusios formos pereinamoji fazė [44].

Vis dėlto, AD patogenezė nėra visiškai aiški. Sutrikusi odos barjero funkcija yra siejama su geno, kuris koduoja filagrino struktūrinį baltymą mutacijomis [36]. Pastebima, kad sergančiųjų odoje trūksta antimikrobinių peptidų tokių kaip katelicidino bei lipidinių molekulių, šių odos komponentų normalus kiekis yra svarbus palaikant odos apsaugines funkcijas [36]. Žinoma, kad AD raiška yra susijusi su vietinio ir sisteminio imuninio atsako sutrikimu dėl epidermio barjero pažeidimo ir sutrikusios sąveikos su aplinkos bei infekciniais veiksniais [36]. Tai gali sąlygoti dirginimo arba niežulio sukeltas įbrėžimas, dėl kurio skatinamas uždegimą skatinančių citokinų išsiskyrimas iš keratinocitų ir aktyvinamos imuninės ląstelės – T limfocitai [44]. Dėl imuninių mechanizmų veikimo inicijuojamos uždegiminės reakcijos ir odos apsauginių funkcijų susilpnėjimas [45]. Dėl pažeistos odos aktyvinamos uždegimą skatinančios imuninės ląstelės, epidermyje esantys keratinocitai išskiria didelius kiekius čiobrialiaukės stromos limfopoetino (TSLP) [45]. TSLP aktyvina dendritines ląsteles arba tiesiogiai veikia odoje infiltruotus T limfocitus ir aktyvina Th2 limfocitus bei jų išskiriamų citokinų gamybą [46,47]. Dėl Th2 limfocitų gaminamų citokinų veikimo padidėja IgE gamyba, kuri gali būti susijusi su ligos sunkumu [48].

AD metu uždegimas pasireiškia ūmia ir lėtine fazėmis [42,44]. Ūmios fazės metu egzeminiai odos pažeidimai kliniškai pasireiškia kaip stipriai niežtinčios, eriteminės papulės [44]. Tokiu būdu, per pažeistą odos barjerą, patekę alergenai skatina sIgE gamybą ir aktyvina Langerhanso ląsteles, kurios

išskiria monocitų chemotaksinį baltymą 1 ir IL-16 bei skatina Th2 limfocitų aktyvumą [49]. Ūminėje AD fazėje vyrauja Th2 limfocitų gaminami citokinai IL-4, IL-5 ir IL-13, kurie skatina didesnę IgE gamybą, sukelia kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulių ekspresiją, o tai skatina infiltraciją eozinofiliais, retais atvejais gali būti stebimas bazofilų ir neutrofilų padidėjimas [49]. IL-4 ir IL-13 taip pat slopina antimikrobinių peptidų indukciją bei keratinocitų apsaugines funkcijas, taip mažindami odos atsparumą *S. aureus* bakterijoms [49]. Skatinama monocitų migracija į odą, aktyvūs monocitai pradeda gaminti uždegimą slopinančius citokinus IL-1 ir navikų nekrozės veiksnį α (TNF- α), taip pat IL-12 ir IL-18, kurie prisideda prie Th2 limfocitų slopinimo ir perėjimo iš Th2 vyravimo į Th1, taip sukeliant lėtinę ligos fazę [50]. Lėtinės AD fazės metu dermoje aptinkami mononuklearinių ląstelių infiltratai su dominuojančiais makrofagais [50]. Pažeistoje odoje sumažėja citokinių IL-4, IL-5 ir IL-13 ekspresija bei padidėja Th1 limfocitų gaminamo interferono- γ (IFN- γ) kiekis [50]. Dėl IFN- γ aktyvinama keratinocitų apoptozė ir skatinamas niežtinčio odos uždegimo – egzemos vystymasis [50].

AD diagnozuojamas remiantis tipiniais klinikiniais simptomais ir, tam tikrais atvejais, sIgE nustatymu [37]. Alerginė reakcijos gali būti vertinamos atliekant alerginius odos mėginius arba *in vitro* tyrimus, kurių metu nustatomas sIgE kiekis kraujyje [37].

1.2.2. Alerginė astma

Astma yra lėtinė uždegiminė kvėpavimo sistemos liga, galinti pasireikšti dusuliu, kosuliu, spaudimo jausmu krūtinėje, įvairaus laipsnio oro srauto obstrukcija ir kvėpavimo takų remodeliavimu [51,52]. Tai nevienalytė liga, pasižyminti skirtingais išsivystymo mechanizmais, simptomais bei atsaku į gydymą [53]. Siekiant detalesnio apibūdinimo, astma yra skirstoma į fenotipus [51,53,54]. Vienas dažniausių astmos fenotipų yra alerginė astma, kuris sudaro daugiau kaip 60 proc. astmos atvejų [51]. Šiam astmos fenotipui būdingi ankstyvi simptomai, kurie dažnai pasireiškia vaikystėje bei sergant kitomis alerginėmis ligomis (atopiniu dermatitu, alerginiu rinitu ir kitomis alergijomis) [51]. Įrodyta, kad alerginis rinitas yra astmos išsivystymo rizikos veiksnys [55,56]. Nustatyta, kad maždaug 75 proc. sergančiųjų AA praneša apie alerginį rinitą, o sergantiems alerginiu rinitu įvertinta didesnė astmos rizika ir mažesnis kvėpavimo takų reaktyvumas nei asmenims, kuriems nenustatytas alerginis rinitas [57]. Tyrimai rodo, kad asmenims, kuriems pasireiškia įsijautrinimas žiedadulkių ar gyvūnų pleiskanų alergenams, astmos rizika padidėja apie 2 proc.; jei toks asmuo serga alerginiu rinitu, astmos rizika padidėja iki 18,8 proc. [57].

AA patogenezė yra susijusi su imuninės sistemos aktyvavimu po sąlyčio su įkvepiamais alergenais, ypač tokiais kaip namų dulkių erkutės, gyvūnų plaukai, pelėsių arba cheminės medžiagos [58]. Po kontakto su alergenu susidaręs IgE prisijungia prie putliųjų ląstelių ir skatina uždegimo mediatorių išsiskyrimą iš putliųjų ląstelių, taip aktyvindamas eozinofilus, neutrofilus, T ir B limfocitus [34]. Pasireiškus pakartotiniam alergeno patekimui į organizmą, suaktyvinami Th2 limfocitai, jų išskiriami citokinai IL-4, IL-5, IL-9 ir IL-13, kurie sukelia lėtinį kvėpavimo takų pažeidimą [34,58]. Th2 sukeltas imuninis atsakas sąlygoja AA požymius, tokius kaip eozinofilinis uždegimas, gleivių hipersekrecija, padidėjęs kvėpavimo takų jautrumas bei padidėjęs IgE kiekis kraujo serume [58]. Atsižvelgiant į Th2 limfocitų sukkelto uždegimo laipsnį astmą galima suskirstyti į mažiausiai du skirtingus endotipus (T2 – didelis ir T2 – mažas) [26]. Priklausomai nuo kontakto su provokuojančiais veiksniais – alergenu, fizinio krūvio ar gretutinių infekcinių ligų, AA simptomų intensyvumas gali kisti visos ligos metu [51]. Klinikinė astmos raiška nėra pastovi, o kvėpavimo funkcijos pokyčiai gali pagerėti ar net visiškai išnykti, tačiau net tada, kai dėl normalios plaučių funkcijos nejaučiama jokių simptomų, besitęsiantis lėtinis uždegimas ir padidėjęs kvėpavimo takų jautrumas dėl tiesioginio ar netiesioginio dirgiklio išlieka [59].

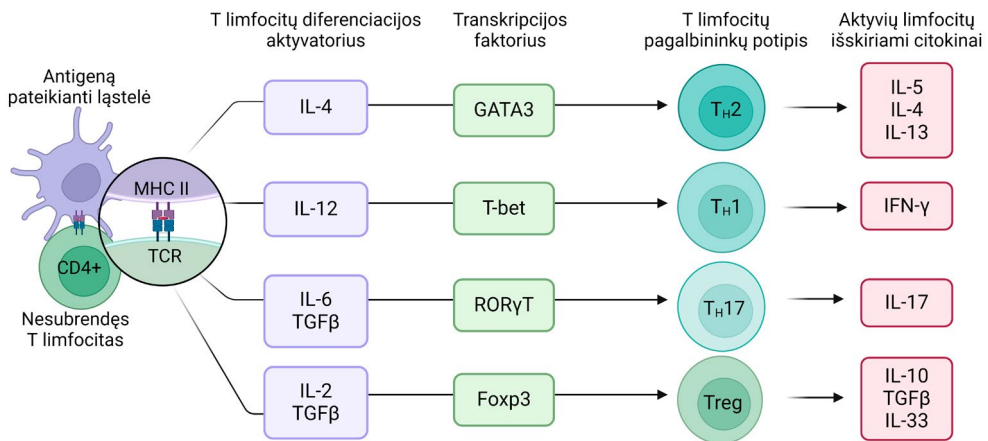
Astma diagnozuojama atliekant standartinius plaučių funkcijos tyrimus, tokius kaip spirometrija, kuri padeda vertinant plaučių funkciją ir yra naudingas metodas nustatant oro srauto apribojimus plaučiuose [59]. Žinoma, kad astmai yra būdinga kintanti plaučių funkcija, todėl spirogramoje gali būti stebimi ne tik pakitę, bet ir normalūs plaučių funkcijos rodikliai. Esant normaliems plaučių funkcijos rodikliams atliekamas inhaliacinis bronchų provokacinis mėginys, kuris yra naudingas siekiant įvertinti kvėpavimo takų jautrumą [60]. Svarbu, tai, kad įtariamą astmos diagnozę patvirtina teigiamas provokacinio tyrimo rezultatas. Tuo tarpu, alerginės astmos fenotipas patvirtinamas įvertinus alergines reakcijas ir nustatčius ligos simptomus provokuojančius alergenus, kai atliekami odos dūrio mėginiai su įkvepiamais alergenais arba *in vitro* tyrimai, skirti sIgE kiekiui kraujyje nustatyti [51].

1.3. Imuninio atsako komponentai

1.3.1. 1-o ir 2-o tipo T limfocitai

T limfocitai, išskiriantys CD4 žymenį (CD4+), yra pagalbinės imuninės ląstelės, kurių veikimas ypač svarbus reguliuojant imuninio atsako mechanizmus atopinių ligų metu. Žinoma, kad atopinėms ligoms būdingas Th2 limfocitų inicijuotas imuninis atsakas ir jų suaktyvinta alerginė reakcija į aplinkos alergenus [11]. Nuo Th1 priklausantis imuninis atsakas iš dalies slopina

Th2 aktyvinamą uždegimą [61]. Todėl atopijos metu svarbu įvertinti Th2 ir Th1 limfocitų bei jų išskiriamų citokinų pusiausvyrą. Jaunų T limfocitų diferenciacija į Th1 arba Th2 limfocitus priklauso nuo T limfocituose gaminamo transkripcijos veiksnio T-box (T-bet) ir GATA surišančio baltymo-3 (GATA-3) veikimo [61]. Antigenui prisijungus prie T limfocitų receptoriaus, poliarizuojantys citokinai, tokie kaip IL-4, IL-12, gauna signalą ir skatina jaunų T limfocitų diferenciaciją į Th1 arba Th2 limfocitus, apibrėžiamus pagal jų gaminamus citokinus [61,62] (1.3.1.1 pav.). Mokslininkų paskelbti duomenys leidžia teigti, kad T-bet inicijuoja Th1 vystymąsi ir slopina Th2 ląstelių diferenciaciją [63].



1.3.1.1 pav. T limfocitų pagalbininkų diferenciacija ir aktyvinimas. (Adaptuota pagal J. J. O'Shea ir W. E. Paul [65])

Th2 limfocitai, aktyvindami uždegiminiuosius procesus, sintetuoja tokius interleukinus kaip IL-4, IL-5, IL-13 [64,65]. Svarbu tai, kad IL-4 ir IL-13 aktyvina B limfocitų proliferaciją, inicijuoja IgE sintezę, skatina eozinofilų ir T limfocitų migraciją į uždegiminiuosius audinius [66]. Be to, IL-4 ir IL-13 skatina jaunos T limfocitus diferencijuotis į Th2 limfocitus ir slopina diferenciaciją į Th1 limfocitus [66]. Th2 limfocitų išskiriamo IL-5 kiekio padidėjimas reikšmingai prisideda prie atopijos patogenezės ir yra ypač reikšmingas nustatant ligos alerginį fenotipą [67]. Svarbu tai, kad IL-5 dalyvauja eozinofilų aktyvacijos procesuose bei veikia putliąsias ląsteles, skatindamas histamino išsiskyrimą [66].

Th1 limfocitų atsakas taip pat yra susijęs su atopijos raiškos požymiais, ypač lėtiniais [68]. Dėl Th1 limfocitų ir jų išskiriamų citokinų veikimo yra skatinama epitelio ląstelių apoptozė, lygiųjų raumenų ląstelių aktyvacija, susijusi su didesniu gleivių kiekio išsiskyrimu [68]. Th1 limfocitų sintetuojami citokinai, tokie kaip IL-1, IL-2, IL-12, IL-10, TNF-α, ypač IFN-γ, slopina Th2

citokinių gamybą, o Th2 sintezuojami citokinai slopina Th1 išskiriamų citokinių gamybą [34,69]. Th2 ir Th1 limfocitų ir jiems būdingų citokinių kiekio pusiausvyros sutrikimai gali sukelti imuninio atsako pokyčius ir skatinti IgE sąlygojamą padidėjusį jautrumą alergenams bei aktyvų imuninį uždegimą [34]. Nustatyta, kad sergantiesiems atopinėmis ligomis būdingas padidėjęs IL-4 kiekis, išskirtas iš aktyvių Th2 limfocitų [69]. Bei, kaip atsakas į aktyvų uždegimą, Th1 limfocituose reikšmingai sumažėjusi IFN- γ gamyba [69]. Tyrimai *in vitro* parodė, kad IFN- γ slopina IL-4 sąlygojamą IgE gamybą, skatindamas jaunų T limfocitų vystymąsi į Th1 limfocitus [69]. Be to, tyrimai rodo, kad atopinių ligų, tokių kaip AD, gydymas rekombinantiniu IFN- γ pagerina pacientų būklę [70], nors rezultatai ne visada susiję su IgE koncentracijos serume sumažėjimu [71].

Remiantis specifinių citokinių gamyba ir (arba) chemokinių receptorių ekspresijos profiliais, neseniai nustatyti nauji T limfocitų pagalbininkų potipiai – Th17 ir Treg limfocitai [72,73]. Th17 ir Treg limfocitų atradimas paskatino pergaltoti Th2 limfocitų atliekamą vaidmenį atopijos patogenezėje. Skirtingas T limfocitų profilis gali būti reikšmingai susijęs su imuninio atsako reguliavimu ir atopinių ligų patogenezė. Tačiau nėra visiškai aišku, kaip skirtingi imuniniai mechanizmai aktyvina alerginio uždegimo kaskadą ir skatina imuninės sistemos komponentų pusiausvyros pakitimus.

1.3.2. 17-o tipo T limfocitai

2005 m. atrastas naujas limfocitų pagalbininkų potipis – Th17 limfocitai, gaminantys ir išskiriantys citokiną IL-17, pasižymintį uždegimą skatinančiomis savybėmis [74]. Imuninio uždegimo metu Th17 limfocitai diferencijuojasi iš jaunų T limfocitų, kai dėl uždegimą reguliuojančių citokinių, tokių kaip transformuojantis augimo veiksnys β (TGF- β) ar IL-6, veikimo aktyvinamas genetiškai specifinis transkripcijos veiksnys, su retinoinės rūgšties receptoriais susijęs receptorius γ t (ROR γ t) [75] (1.3.1.1 pav.). Th17 limfocitų diferenciacijos metu ROR γ t tiesiogiai prisijungia prie IL-17 ir skatina Th17 limfocitų aktyvumą [76]. Taip pat nustatyta, kad Th17 padidėjimas gali būti susijęs su aktyvesniu Th2 limfocitų veikimu, Th1/Th2 limfocitų balanso sutrikimu bei tokių atopinių ligų kaip atopinis dermatitas sunkumu [77]. Kombinuotas, Th1/Th17 arba Th2/Th17 pusiausvyros sutrikimo sąlygotas imuninis atsakas gali papildomai paskatinti atopinių ligų sunkumą. Be to, Looman ir mokslininkų grupės tyrimas su atopinėmis ligomis sergančiais vaikais parodė, kad alerginį įsijautrinimą turinčių vaikų Th2 ir Th17 limfocitų skaičius periferiniame kraujyje buvo didesnis, nei vaikų be alerginio įsijautrinimo [78]. Sun ir bendraautorių atliktas tyrimas atskleidė, kad Th17 limfocitai ir jų išskiriami citokinai išprovokuoja astmos vystymąsi ir vaidina svarbų vaidmenį kvėpavi-

mo takų pertvarkoje [79]. Tokius tyrimų rezultatus papildė nustatytas reikšmingas ryšys tarp Th2 ir Th17 limfocitų gaminamų citokinų ir atopijos bei eozinofilinio uždegimo [15]. Atsižvelgiant į tai galima daryti prielaidą, kad Th2 ląstelių ryšys su Th17 imuniniu atsaku gali būti reikšmingas atopinių ligų patogenezėje ir būti susijęs su alerginio uždegimo sunkumu. Vis dėlto, Zou ir kt. išanalizavo sąsajas tarp Th17/Treg santykio ir plaučių funkcijos rodiklių bei astmos sunkumo ir atskleidė reikšmingą Th17 limfocitų kiekio padidėjimo bei Th17/Treg limfocitų pusiausvyros sutrikimo ryšį su astmos sunkumu, tačiau tyrimo metu sergantiesiems astma nebuvo aptiktas Th2 limfocitų populiacijos padidėjimas [12].

Manoma, kad Th17 limfocitai yra netiesiogiai susiję su neutrofilais, nes Th17 gaminami TNF- α ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantis veiksnys (GM-CSF) prisideda prie neutrofilų aktyvumo, jų infiltracijos audiniuose ir išgyvenamumo [76,80]. Tačiau Th17 limfocitai ir jų gaminami citokinai IL-17 taip pat dalyvauja aktyvindami Th2 limfocitus ir gali būti reikšmingi alerginio uždegimo metu [80]. Nustatyta, kad IL-17 skatina B ląstelių diferenciaciją į IgE gaminančias plazmos ląsteles, inicijuoja kai kurių citokinų gamybą, tokių kaip IL-8, TNF- α ir TSLP, bei dalyvauja nuo Th2 limfocitų priklausancio imuninio atsako reguliavime [80]. Atliktas eksperimentinis tyrimas su AD sergančiomis pelėmis parodė, kad IL-17 reguliuoja Th2 tipo atsakus [81]. Tyrimo metu pastebėta, kad IL-17 suaktyvino Th2 limfocitų gaminamų IL-4 sintezę, o sumažėjusi IL-4 ir IgE koncentracija priklausė nuo IL-17 sumažėjimo [81]. Kito eksperimentinio tyrimo su alerginiu rinitu sergančiomis pelėmis rezultatai parodė, kad IL-17 veikimo slopinimas pastebimai sumažino eozinofilų ir neutrofilų infiltraciją bei Th17 ir Th2 veikimą ir padidino Treg limfocitų atsaką [82].

Žinoma, kad IL-17 šeimą sudaro šeši nariai, kurie veikia per IL-17 receptorių [83]. Labiausiai ištirtas IL-17 šeimos narys yra IL-17A [83]. IL-17A yra svarbus neutrofilų prisitraukimo į infekcijos ar uždegimo vietas induktorius, tačiau atopinių ligų kontekste pastebėtas padidėjęs IL-17A kiekis, o tai rodo, kad jis atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant imuninius mechanizmus alerginio uždegimo metu [84]. Eksperimentinis tyrimas parodė, kad *in vitro* Th17 limfocitų pašalinimas iš AA ir AD sergančių tiriamųjų periferinio kraujo buvo susijęs su sumažėjusiu IgE kiekiu, o rekombinantinio IL-17A pridėjimas – su padidėjusiu IgE kiekiu [85]. Tokie rezultatai atskleidžia potencialiai reikšmingą Th17 limfocitų ir jų gaminamų citokinų, ypač IL-17A, vaidmenį atopinių ligų patogenezėje.

1.3.3. T reguliaciniai limfocitai

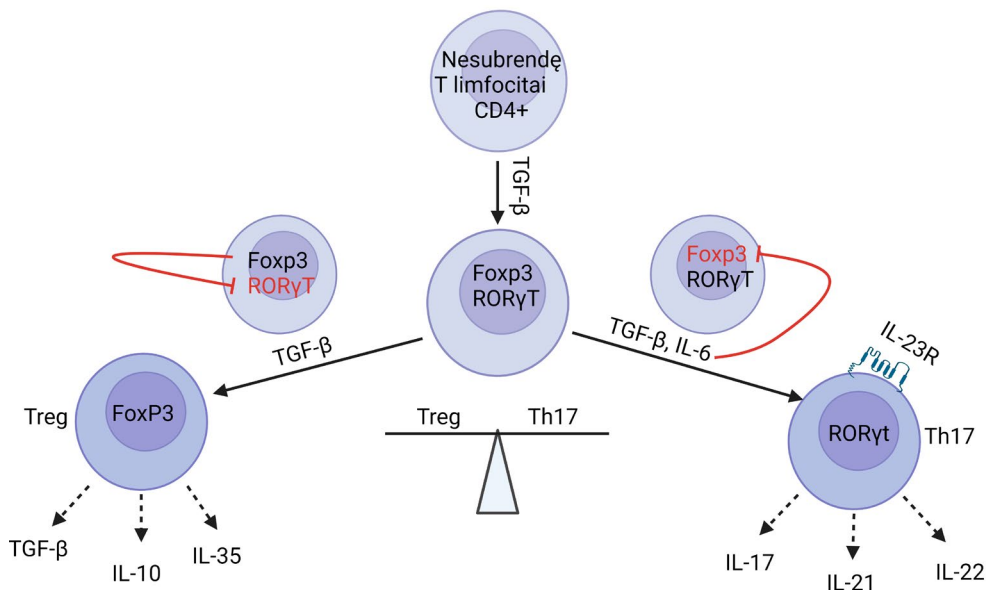
Imuninį atsaką aktyviai reguliuoja ir jį slopinančiomis savybėmis pasižymi nedidelė CD4⁺ populiacija – Treg limfocitai. Sveiko žmogaus periferiniame kraujyje Treg limfocitai sudaro 5–10 proc. T limfocitų populiacijos, tačiau atlieka ypač reikšmingą vaidmenį imuninio atsako reguliavime [13]. Treg yra gaminami užkrūčio liaukoje, vystantis T ląstelėms, arba iš periferijoje esančių jaunų T limfocitų, dėl antigeno stimuliacijos veikiant TGF- β ir IL-2 [86]. Išskirdami uždegimą slopinančius citokinus, tokius kaip TGF- β , IL-10, IL-35, Treg limfocitai pasižymi slopinančiu poveikiu imuninėse reakcijose dalyvaujančių T limfocitų, NK ląstelių, putliųjų ląstelių, bazofilų, eozinofilų, antigeną pateikiančių ląstelių veikimui [87,88]. Treg slopina per daug aktyvų imuninį atsaką, uždegimines reakcijas ir skatina imuninę toleranciją [89]. Ypač svarbu tai, kad Treg limfocitai gali slopinti efektorinių Th limfocitų, tokių kaip Th2 arba Th17, proliferaciją ir aktyvaciją atopijos metu [13]. Didėjant Th2 ir Th17 limfocitų skaičiui, taip pat padidėja ir Treg limfocitų kiekis, tačiau atopinėms ligoms būdingas santykinis Treg trūkumas, susijęs su Th2 ir Th17 limfocitų padidėjimu [14,73,90].

Atopinės ligos yra susijusios su sutrikusia tolerancija alergenui ir padidėjusiu imuniniu atsaku, dalyvaujant Th2 limfocitams, todėl Treg limfocitų veikimas yra ypač reikšmingas slopinant ir kontroliuojant alergenų inicijuotą imuninį atsaką [73]. Remiantis klinikinių tyrimų rezultatais, nustatyta, kad Treg reguliuoja autoimuninį atsaką ir vaidina svarbų vaidmenį sergant daugeliu alerginių, autoimuninių ir uždegiminių ligų [13,86,91]. Vis dėlto, mechanizmai, kuriais Treg limfocitai kontroliuoja alerginius ir autoimuninius atsakus, nėra detalai išaiškinti. Iš pradžių Treg limfocitai apibūdinti kaip CD4⁺ T limfocitų populiacija, ekspresuojanti IL-2 receptoriaus α grandinę ir CD45RB, galinti apsaugoti nuo autoimuninių ligų išsivystymo [92,93]. Vėliau, dėl vidubranduolinio transkripcijos veiksnio Foxp3 identifikavimo Treg limfocitai apibūdinti kaip atskiras CD4⁺ T limfocitų pogrupis [94].

Aktyvūs Treg limfocitai gamina ir išskiria Foxp3, kuris svarbus limfocitų vystymuisi ir aktyvumui [95]. Foxp3 yra pagrindinis Treg limfocitų funkcijos reguliatorius, jis dalyvauja reguliuojant citokino IL-10 gamybą ir taip skatina Treg limfocitų funkcinį aktyvumą [13]. Šio žymens ekspresija Treg limfocituose – ypač reikšmingas rodiklis Treg limfocitų vertinimui. Foxp3 nustatymas padeda identifikuoti aktyvius Treg limfocitus ir atskirti juos nuo kitų T limfocitų populiacijų. Nustatyta, kad Foxp3 trūkumas yra susijęs su padidėjusiu IgE ir kraujo eozinofilų kiekiu bei atopijos vystymusi, įskaitant AD, AA [73,90]. Aktyvios alerginės reakcijos ir jų išsivystymas gali atsirasti dėl sutrikusios Treg funkcijos dėl Foxp3 ekspresijos sumažėjimo [73,90,96]. Zhu ir mokslininkų grupė atlikto tyrimo rezultatai parodė, kad

CD4+CD25+Foxp3+ Treg limfocitų proc. CD4+ limfocitų populiacijoje ir Foxp3 ekspresija buvo reikšmingai mažesnė astma sergantiems vaikams nei kontrolinės grupės tiriamiesiems [96]. Tai parodo, kad vertinant atopines ligas svarbu atsižvelgti ne tik į Treg limfocitų skaičių, bet ir į funkcinius ląstelių rodiklius. Chen su bendraautoriais atliktas tyrimas atskleidė, kad sergantiems vidutinio sunkumo ir sunkia astma yra pakitęs Th2/Treg ląstelių santykis, nors sergančiųjų Treg limfocitų proliferacinis aktyvumas ir jų kiekis buvo mažesnis nei sveikų asmenų, tačiau sergančiųjų Treg ląstelės ekspresavo daugiau Foxp3 [97]. Tokie duomenys atskleidžia, kad ligų patogenezėje svarbus ne tik Treg limfocitų kiekis, bet ir funkcinio aktyvumo sutrikimas.

Atradus Th17 limfocitus, ypač reikšmingas tapo Th17 ir Treg limfocitų santykis. Įprastai Treg ir Th17 limfocitai kontroliuoja vienas kito dauginimąsi, kad išlaikytų pusiausvyrą (1.3.3.1 pav.) [76]. Žinoma, kad TGF- β atlieka dvigubą vaidmenį diferencijuojant šiuos du T limfocitų pogrupius [76]. Jaunuose T limfocituose skatindamas Foxp3 ekspresiją, TGF- β aktyvina Treg limfocitų vystymąsi. Tačiau dėl IL-6 veikimo Treg gamyba slopinama ir skatinamas IL-23R ir ROR γ t veikimas, taip skatinant jaunų T limfocitų vystymąsi į Th17 limfocitus [76]. Vis dėlto, TGF- β , skatindamas Foxp3 ekspresiją, slopindamas IL-23R ir ROR γ t veikimą, neigiamai reguliuoja Th17 ląstelių diferenciaciją [76]. Toks, vienas nuo kito priklausomas Th17/Treg diferenciacijos reguliavimas yra ypač svarbus imuninės homeostazės palaikymui ir alerginio uždegimo reguliavimui. Mokslininkų gauti duomenys rodo, kad atopinių ligų progresavimui Th17/Treg limfocitų pusiausvyros sutrikimas gali būti reikšmingesnis nei Th1/Th2 limfocitų pusiausvyra [12]. Nustatyta, kad Treg/Th17 pusiausvyros sutrikimas dėl santykinio Treg limfocitų trūkumo ar funkcijos sutrikimo gali būti susijęs su atopinių ligų vystymosi mechanizmais [89,98]. Tokie rezultatai atskleidžia, kad kontroliuojant atopines ligas turėtų būti atsižvelgta ne tik į Th1/Th2 pusiausvyros sutrikimą, bet ir į Th17/Treg limfocitų reguliavimą.



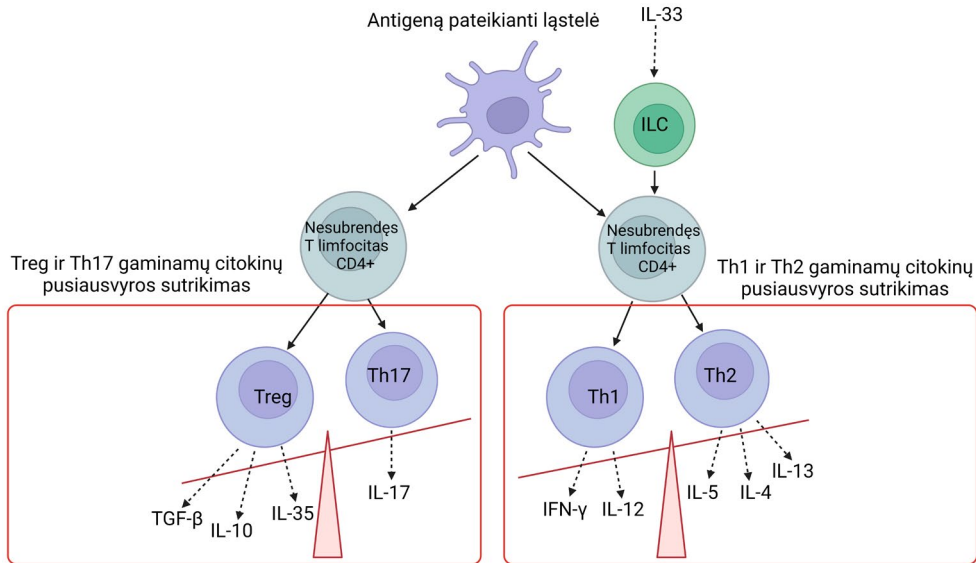
1.3.3.1 pav. Treg ir Th17 limfocitų vystymosi mechanizmas ir pusiausvyros reguliavimas (Adaptuota pagal Fasching P. ir kiti [76]).

Treg limfocitai išsivysto iš nesubrendusių T limfocitų pagalbininkų, kai dėl transformuojančio augimo veiksnio β (TGF- β) signalizacijos aktyvuojamas transkripcijos veiksnys Foxp3, kuris yra pagrindinis veiksnys aktyvių Treg limfocitų vystymuisi. Aktyvūs Treg išskiria tokius citokinus kaip IL-10, IL-35 ir jų tolimesnei aktyvacijai svarbų TGF- β . Tačiau TGF- β kartu su IL-6 yra atsakingi už Th17 limfocitų vystymąsi iš nesubrendusių T limfocitų pagalbininkų: IL-6 kartu su TGF- β aktyvina retinoinės rūgšties receptoriaus variantą γ t (ROR γ t), kuris yra pagrindinis Th17 ląstelių vystymosi ir funkcijos reguliatorius. Taigi, TGF- β dalyvauja inicijuojant abiejų šių T limfocitų subtipų gamybą, tačiau Foxp3 slopina ROR γ t aktyvumą, o Th17 limfocitų vystymuisi svarbus IL-6 slopina Foxp3 aktyvumą ir Treg gamybą, todėl šių limfocitų diferenciacija ir funkcija yra glaudžiai susijusios ir gali būti tarpusavyje konkurencingos.

1.3.4. Uždegimą skatinantys ir slopinantys citokinai

Atopijos metu pasireiškia aktyvus imuninis atsakas, susijęs su Th2 limfocitų vystymuisi ir jų išskiriamais citokinais, tokiais kaip IL-4, IL-5, IL-13, kurie kartu su Th17 limfocitų gaminamu citokiniu IL-17 skatina imuninę uždegimą [11]. Įprastai yra palaikoma pusiausvyra tarp uždegimą skatinančių ir uždegimą slopinančių citokinių: Th1 išskiriami, uždegimą slopinantys citokinai slopina Th2 aktyvumą, o Th2 citokinai IL-4, IL-5, IL-13, skatinantys uždegimines reakcijas, dalyvauja slopinant Th1 išskiriamų citokinių gamybą [66]. Be to, Treg limfocitai išskiria uždegimą slopinančius citokinus, tokius

kaip TGF- β , IL-10 ir IL-35, reikšmingus slopinant adaptyvų ir įgimtą imuninę atsaką [99–101]. Tačiau atopijos metu šių citokinų pusiausvyra sutrinka. Atopijos metu būdingas santykinis Treg ir Th1 gaminamų citokinų trūkumas, susijęs su Th2 ir Th17 limfocitų ir jų išskiriamų citokinų padidėjimu (1.3.4.1 pav.).



1.3.4.1 pav. Uždegimą skatinančių ir uždegimą slopinančių citokinų pusiausvyra atopijos metu. (Adaptuota pagal Akdis C.A. ir kiti [66], Calzada D. ir kiti [99], Cayrol C. ir kiti [130])

Atopija pasižymi padidėjusiu Th2, Th17 limfocitų ir sumažėjusiu Treg limfocitų kiekiu bei funkciniu aktyvumu. Sumažėjus Treg ir Th1 limfocitų išskiriamų uždegimą slopinančių citokinų (TGF- β , IL-10, IL-35, IFN- γ , IL-12) kiekiui, padidėja Th2 ir Th17 gaminamų uždegimą skatinančių citokinų (IL-5, IL-4, IL-13, IL-17) kiekis ir įsivyroja jų pusiausvyros sutrikimas. Uždegimo skatinime svarbų vaidmenį atlieka IL-33, kuris prisideda aktyvinant Th2 limfocitų veikimą, skatindamas įgimtų limfocitų (ILC) aktyvumą.

Uždegimą slopinantis citokinas TGF- β yra Treg limfocitų gaminamas citokinas, kurio pagrindinė funkcija imuninėje sistemoje yra palaikyti toleranciją reguliuojant limfocitų proliferaciją, diferenciaciją ir išgyvenamumą [102]. TGF- β kontroliuoja uždegimines reakcijas, reguliuodamas chemotaksį, limfocitų aktyvaciją, NK ląstelių, dendritinių ląstelių, makrofagų, putliųjų ląstelių ir granulocitų veikimą [102]. Naujausi tyrimai rodo, kad TGF- β gali slopinti atopinių ligų vystymąsi, skatindamas Treg limfocitų diferenciaciją ir slopindamas IL-17 gamybą Th17 limfocituose, mažindamas B limfocitų aktyvumą ir IgE gamybą bei slopindamas putliųjų ląstelių degranuliaciją.

ją [103,104]. Svarbu tai, kad dideli IL-10 ir TGF- β kiekiai, kuriuos išskiria Treg limfocitai, slopina IgE gamybą, tačiau tuo pat metu aktyvinama IgG4 ir IgA gamyba B limfocituose [105]. Žinoma, kad žmogaus organizme ekspresuojamos trys TGF- β izoformos: TGF- β 1, TGF- β 2 ir TGF- β 3 [103]. Tačiau TGF- β 1 yra labiausiai paplitusi TGF- β izoforma, specifiskai ekspresuojama Treg limfocituose [103]. TGF- β 1 yra susijęs su įgimto imuninio atsako imuninių ląstelių (makrofagų, dendritinių ląstelių) raiškos bei adaptyvaus imuninio atsako komponentų (T ir B limfocitų) funkcijos reguliavimu [103]. Mokslinių tyrimų duomenys rodo, kad TGF- β 1 reikšmingai dalyvauja slopinant imuninį uždegimą ir yra susijęs su atopinių ligų sunkumu [106–108]. Be to, TGF- β 1 kiekio padidėjimas serume gali būti susijęs su padidėjusia oro srauto obstrukcija bei susilpnėjusiu eozinofiliniu uždegimu [106]. Vis dėlto, tyrimų rezultatai prieštaringi, ne visi duomenys rodo reikšmingus TGF- β 1 koncentracijos serume skirtumus tarp sergančiųjų atopinėmis ligomis ir sveikų tiriamųjų [109].

Kitas Treg limfocitų gaminamas citokinas IL-35 yra naujas heterodimerinių citokininų IL-12 šeimos narys. Tai citokinas, sudarytas iš dviejų skirtingų subvienetų: Epstein-Barr viruso sukulto geno 3 – EB13 ir IL-12 subvieneto [110]. Nuo kitų šeimos narių šis citokinas skiriasi tuo, kad yra griežtai vertinamas kaip imuninį uždegimą slopinantis citokinas, kurio didžiausius kiekius gamina Treg limfocitai [110]. Eksperimentinių tyrimų metu su pelėmis, įvedus plazmidę, kuri padidina IL-35 gamybą rezultatai atskleidė, kad IL-35 citokino veikimas gali būti susijęs su mažesniu kvėpavimo takų uždegimu [111]. Pastebėta, kad dėl IL-35 veikimo sumažėja eozinofilijos, neutrofilijos, IgE ir IL-4 kiekiai [111]. Manoma, kad IL-35 dalyvauja aktyvinant IL-10 veikimą ir gali būti reikšmingai susijęs su imuninio uždegimo slopinimu bei lengvesne atopinių ligų eiga [112]. Atlikti tyrimai rodo, kad IL-35 tiesiogiai slopina Th17 ląstelių diferenciaciją, sumažindamas IL-17 ir ROR γ t gamybą, reguliuojantis Th17 ląstelių diferenciaciją [113,114]. Tyrimų duomenys rodo, kad sergantiesiems atopinėmis ligomis nustatomas reikšmingai mažesnis IL-35 lygis nei sveikiems asmenims [115] bei patvirtina, kad šis citokinas reikšmingai prisideda kontroliuojant imuninį atsaką ir alerginio uždegimo reakcijas [116].

Atlikti mokslininkų tyrimai parodė, kad Treg limfocitų funkcijos slopinant alerginį uždegimą priklauso nuo jų gebėjimo sukelti IL-10 gamybą T limfocituose [117]. IL-10 gamina daugybė ląstelių tipų, įskaitant ir Treg limfocitus [117]. Tai – citokinas, pasižymintis gebėjimu reguliuoti pusiausvyrą tarp Th limfocitų pogrupių ir moduluoti ląstelių, dalyvaujančių alerginėse reakcijose (putliųjų ląstelių, Th2 limfocitų, eozinofilų), aktyvumą [118–120]. Be to, IL-10 gali veikti kaip bendras inhibitorius slopinant uždegimą; svarbu, kad IL-10 slopina IFN- γ gamybą Th1 limfocituose, taip užtikrindamas grįžtamąjį

neigiamą ryšį ir skatindamas didesnę IFN- γ išsiskyrimą, kuris reikšmingai prisideda reguliuojant Th1/Th2 limfocitų pusiausvyrą [121]. Tačiau tikslus IL-10 veikimas atopijos metu yra prieštaringas: vienuose tyrimuose nustatytas IL-10 padidėjimas atopijos metu, kituose – sumažėjimas [122–124]. Atlikti tyrimai rodo, kad IL-10 tiesiogiai slopina Th2 limfocitus bei dalyvauja kontroliuojant pusiausvyrą tarp Th17 ir Treg limfocitų [125,126]. Tačiau taip pat buvo pranešta, kad IL-10 veikimas nėra reikšmingas kontroliuojant eozinofilinį uždegimą ir net gali būti susijęs su alergenu sukkelto kvėpavimo takų reaktyvumo padidėjimu [127,128]. Naujausi tyrimai rodo, kad IL-10 gali skatinti putliųjų ląstelių aktyvaciją ir taip inicijuoti IgE gamybą bei alerginį uždegimą [129]. Tikėtina, kad Th2 limfocitų inicijuotą uždegimą skatinantis citokinas IL-33 taip pat yra susijęs su didesniu IL-10 aktyvumu, o IL-10 padidėjimas gali aktyvinti IL-13, slopinti TNF- α gamybą bei reguliuoti putliųjų ląstelių aktyvumą ir degranuliaciją, taip aktyvindamas IL-33 receptorių ST2 ir skatindamas tolimesnę IL-33 išsiskyrimą [129]. Taigi, tokie duomenys atskleidžia IL-10, ST2 receptoriaus ir IL-33 kaskados veikimą bei prieštaringai vertinamą IL-10 vaidmenį skatinant imuninį uždegimą atopijos metu.

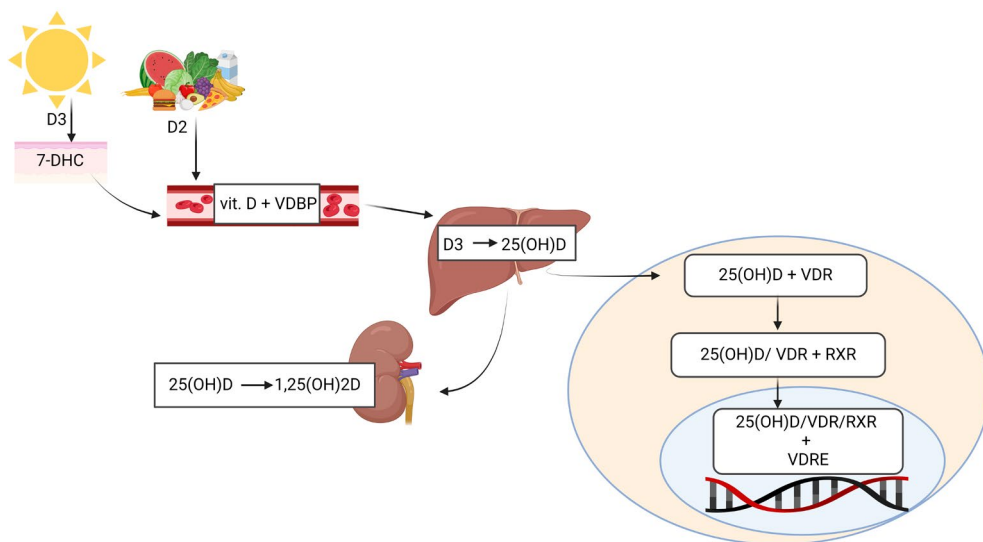
Citokinas IL-33 gali atlikti tiesioginį poveikį Th limfocitų profilio kitiems ir taip prisidėti prie imuninio uždegimo skatinimo [130] (1.3.4.1. pav.). Tai – IL-1 šeimos narys, skirtingai nuo kitų šeimos narių, veikiamas aplinkos veiksnių. IL-33 ekspresuojamas ne kraujodaros, bet epitelio ląstelėse (keratinocituose epidermyje, plaučių epitelio ląstelėse ir kt.) ir fibroblastuose [131,132]. Šis citokinas paprastai randamas ląstelės branduolyje ir veikia kaip transkripcijos veiksnys [131,133]. Ląstelių branduoliuose esantis IL-33, skatindamas chromatiną kondensaciją, slopina genų ekspresiją [134]. Be to, branduolinio IL-33 sulaukymas yra pagrindinis jo ekstraląstelinio aktyvumo reguliatorius, užkertantis kelią nekontroliuojamam jo išsiskyrimui už ląstelės ribų [132]. IL-33 funkcija priklauso nuo prisijungimo prie receptoriaus ST2 [135], kurio izoformos randamos įgimtos ir adaptyviose imuninėse ląstelėse, įskaitant putliąsias ląsteles, eozinofilus, bazofilus, Th2 limfocitus, limfoidines ląsteles, dendritines ląsteles, NK ląsteles ir keratinocitus [131,136–138]. IL-33, prisijungęs prie ST2 receptoriaus, gali moduluoti įvairių tipų imuninės sistemos ląsteles, ypač 2 tipo įgimtas limfoidines ląsteles [130], taip aktyvindamas įgimtą imuninį atsaką ir inicijuodamas su Th2 limfocitais susijusias reakcijas (1.3.4.1 pav.). Nustatyta, kad uždegiminė aplinka pažeistame audinyje yra susijusi su IL-33 biologiniu aktyvumu [131]. IL-33 pasyviai išsiskiria iš nekrozuojančių ląstelių ir veikia kaip pavojaus signalas, sukeldamas daugybę biologinių padarinių, nukreiptų pašalinti grėsmę ir atstatyti homeostazę [131]. Taip pat IL-33 skatina eozinofilų infiltraciją audiniuose ir yra siejamas su alergenu sukeltu kvėpavimo takų uždegimu bei padidėjusiu kvėpavimo takų jautrumu [135,139]. Be to, mokslinių tyrimų su pelėmis

rezultatai parodė, kad per didelė IL-33 ekspresija lemia spontanišką atopinio dermatito, atopinio keratokonjunktyvito vystymąsi [140], todėl šio citokino vaidmuo gali būti ypač reikšmingas atopinių ligų vystymuisi.

1.4. Vitaminas D

1.4.1. Vitamino D apykaita

Vitamino D apykaita yra kompleksinis procesas, kuris prasideda, kai į žmogaus organizmą vitaminas D patenka su maistu, per žarnyną arba veikiant saulės ultravioletinei spinduliutei (UV), per odą [141]. Pagrindiniai vitamino D metabolitai yra cholekalciferolis (D3), gaunamas su gyvūninės kilmės maistu ir dėl saulės ultravioletinės spinduliuotės poveikio, bei ergokalciferolis (D2), į organizmą patenkantis su negyvūninės kilmės maistu [141]. Vitaminas D per odą patenka į kraujotaką, kai susidaręs 7-dehidrocholesterolio (7-DHC) dėl saulės spinduliuotės poveikio virsta previtaminu D, o sekančiame etape – vitamino D forma D3 [141]. Su maistu gautas vitaminas D absorbuojamas žarnyno sienelėse ir per limfinę sistemą patenka į kraujotaką [141]. Vitamino D metabolitai kraujyje prisijungia prie vitamino D pernešančių baltymų, ypač prie GC baltymo [141]. Sveiko žmogaus organizme maždaug 0,03 proc. 25(OH)D yra laisvoje formoje; 85 proc. yra prisijungę prie GC baltymo ir 15 proc. – prie albumino [142]. Vitamino D metabolitai, prisijungę prie GC baltymo, yra pernešami į kepenis, kur paverčiami 25(OH)D [141]. Vitamino D apykaitos kelyje 25(OH)D, patekęs į kraujotaką, vėl susijungia su GC baltymu ir yra nugabenamas į inkstus, kur virsta aktyvia vitamino D forma 1,25(OH)₂D, o GC yra suskaidomas ląstelių lizosomose [141]. Šią reakciją kontroliuoja parathormonas (PTH), kalcis, fosfatas, kalcitoninas ir fibroblastų augimą reguliuojantis veiksnys 23 (FGF23) bei pats vitaminas D [143–145]. Vitamino D metabolizmo metu kepenyse susidariusi aktyvi vitamino D forma prisiriša prie ląstelėse esančio VDR [146]. Susijungus su vitaminu D, VDR tampa aktyvuoto DNR surišančio transkripcijos veiksnio ligandu, kuris sukuria aktyvų signalo perdavimo kompleksą. Toks kompleksas sudaro vitamino D ir VDR heterodimerą, kuris prisijungia prie retinoidinio X receptoriaus (RXR) [146]. Susidaręs kompleksas patenka į ląstelės branduolį ir prisijungia prie vitamino D atsako elemento (VDRE) DNR regionų geno promotoriuje bei veikia kaip transkripcijos veiksnys, reguliuodamas tam tikrų genų transkripciją [146]. Priklausomai nuo stimuliuojančių ar slopinančių veiksnių, šis kompleksas gali veikti kaip nuo ligandų priklausomas aktyvatorius arba genų transkripcijos slopintojas [146]. Taip VDR gali prisidėti kontroliuojant genų raišką ir vitamino D biologinį atsaką (1.4.1.1 pav.).



1.4.1.1 pav. Vitamino D apykaitos schema
(Adaptuota pagal Awasthi R. ir kiti [146])

Vitaminas D į organizmą patenka per odą (kaip vitaminas D₃, kuris sintezuojamas iš 7-dehidrocholesterolio (7-DHC) veikiant UV spinduliams) arba su maistu (vitaminas D₂). Vitaminas D patekęs į kraują prisijungia prie vitamino D pernešančių baltymų, ypač prie vitamino D surišančio baltymo (GC) ir pernešamas į kepenis. Toliau vyksta neaktyvių vitamino D metabolitų aktyvinimas: kepenyse į 25(OH)D, inkstuose į 1,25(OH)₂D. Susidariusi aktyvi vitamino D forma patenka į organizmo ląsteles dėl juose esančio vitamino D receptariaus (VDR) ir taip gali dalyvauti organizme vykstančiuose procesuose.

Veikiant 25-hidroksivitamino D-24-hidroksilazės fermentui susidariusios vitamino D formos – tiek 25(OH)D, tiek 1,25(OH)₂D, yra suardomos į biologiškai neaktyvią, vandenyje tirpstančią kalcitriolinę rūgšį [141]. 1,25(OH)₂D veikimas yra greitas ir reguliuojamas pagal organizmo poreikius, tačiau jo gyvavimo trukmė labai trumpa. 1,25(OH)₂D pusinės eliminacijos laikas yra apie 4–6 valandos [147]. 25(OH)D kraujyje cirkuliuoja ilgiau, jo pusinės eliminacijos laikas yra apie 2–3 savaitės [147]. Dėl ilgesnės gyvavimo trukmės, siekiant įvertinti vitamino D atsargas organizme, rekomenduojama tirti 25(OH)D koncentraciją kraujyje [147]. Svarbu tai, kad šio vitamino D metabolito kiekis reikšmingai priklauso nuo jo įsisavinimo ląstelėse [148].

1.4.2. Vitamino D trūkumas

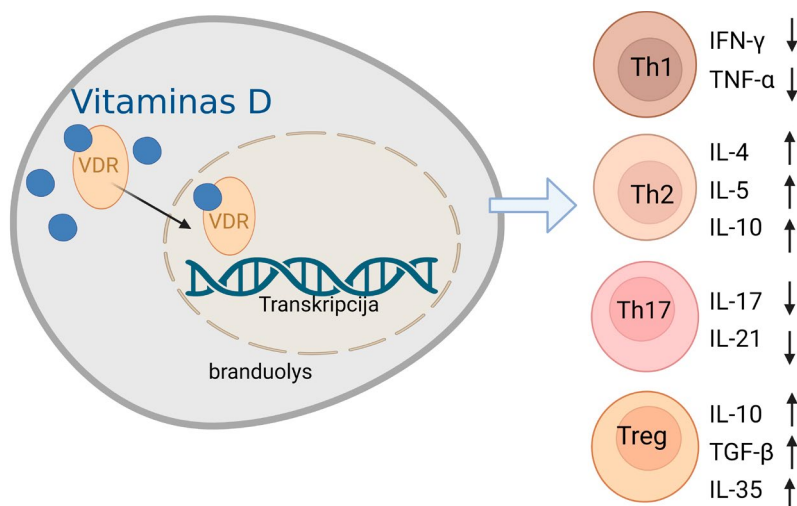
Rekomendacijose pateikiamas skirtingas vitamino D trūkumo ribinis apibrėžimas. Atsižvelgdami į metabolinių kaulų ligų riziką, JAV medicinos institutas (IOM) priėmė sprendimą, kad 25(OH)D vertė serume mažiau 12 ng/ml laikoma vitamino D trūkumu, 12–20 ng/ml laikoma vitamino D nepakan-

kamumu, o ≥ 20 ng/ml – pakankamu vitamino D kiekiu [149]. Tačiau atsižvelgdami į su amžiumi didėjantį cirkuliuojančio PTH kiekį, Tarptautinė endokrinologų draugija nustatė kitokias vitamino D sumažėjimo ribas, kai vitamino D trūkumas apibūdinamas tuomet, jei kraujyje nustatytas jo kiekis yra mažesnis nei 20 ng/ml (< 50 nmol/l), nepakankamumas – kai nustatytas vitamino D kiekis kraujyje 20–30 ng/ml (50–75 nmol/l), normalus vitamino D kiekis kraujyje yra 30–50 ng/ml (75–125 nmol/l) [150–153]. Nepaisant skirtumų, visose gairėse pasiektas sutarimas, kad 25(OH)D kiekio serume vertė, mažesnė nei 10–12 ng/ml (25–30 nmol/l), turėtų būti vengiama bet kokio amžiaus asmenims. Turėtų būti siekiama, kad tiek vaikams, tiek suaugusiems 25(OH)D kiekis kraujo serume būtų > 30 ng/ml.

Nors saulės poveikis ir mityba yra vieni iš svarbiausių priežastinių veiksnių vitamino D gamybai ir jo normalaus kiekio palaikymui organizme, tačiau net saulėtose, geografiškai palankiose bei besivystančiose šalyse vitamino D trūkumas yra dažnas atvejis [154]. Rizikos veiksniai, lemiantys vitamino D trūkumą, gali būti tokie kaip geografinė vietovė, kurioje yra mažiau saulės spinduliuotės, sezonas, oro tarša, mitybos įpročiai [155]. Mažas vitamino D kiekis organizme gali būti susiję su laiko, praleidžiamo patalpose, pokyčiais ir apsaugos nuo saulės naudojimu [155]. Be to, genų sąveika su aplinkos veiksniais, tokiais kaip saulės spinduliai, mityba arba *VDR* ir *GC* genų sąveika su kitais genais, dalyvaujančiais vitamino D metabolizme, gali atlikti papildomą vaidmenį, ypač sergant atopinėmis ligomis. Nepaisant to, kad mokslininkų tyrimai atskleidžia vis daugiau detalių informacijos apie vitaminą D ir jo veikimo mechanizmus, naujausi duomenys rodo, kad pasaulyje vitamino D trūkumas išlieka paplitęs [154]. Tikėtina, kad ypač dažnai nustatomas vitamino D trūkumas prisideda prie įvairių pasaulyje paplitusių ligų, taip pat ir atopijos, naštos.

1.4.3. Vitaminas D ir imunitetas

Gerai žinoma, kad vitaminas D yra svarbus palaikant kalcio ir fosforo homeostazę, taip pat būtinas skeleto formavimosi periodu, palaikant normalią kaulų ir mineralinių medžiagų apykaitą bei skeleto tvirtumą [156]. Tačiau vitamino D poveikis žmogaus organizmui yra gerokai platesnis, o mokslininkų tyrimai atskleidė reikšmingą vitamino D vaidmenį reguliuojant imuninį atsaką ir slopinant uždegimą [157]. Pastebėta, kad vitaminas D yra svarbus specifinio imuninio atsako modulatorius ir gali dalyvauti reguliuojant su T limfocitais susijusį imuninį atsaką (1.4.3.1 pav.). Manoma, kad šis vitaminas atlieka svarų vaidmenį atopinių ligų patogenezėje, o jo trūkumas gali būti susijęs su AD ir AA paplitimu [157]. Todėl pastaruoju metu išaugo susidomėjimas vitamino D vaidmeniu atopinių ligų patogenezėje.



1.4.3.1 pav. Vitamino D vaidmuo imuninio atsako reguliavime.
(Adaptuota pagal Martens P.J ir kiti [157])

Veikdamas per VDR, esantį įvairiose imuninėse ląstelėse, įskaitant B ir T limfocitus, dendritines ląsteles, makrofagus [158,159], vitaminas D dalyvauja reguliuojant atsaką į alergeno sukeltus uždegiminius procesus [160]. Tyrimai rodo, kad vitaminas D veikia mažindamas MHC II klasės molekulių ekspresiją ir slopindamas dendritinių ląstelių diferenciaciją ir brendimą, išsaugant nesubrendusių ląstelių fenotipą [161]. Vitaminas D sumažina receptorių ekspresiją dendritinėse ląstelėse ir prisideda prie jų metabolizmo reguliavimo [162,163]. Svarbu tai, kad veikdamas dendritines ląsteles vitaminas D mažina vietinį ir sisteminį uždegimą, slopindamas uždegimą skatinančių citokinų išsiskyrimą iš T limfocitų [7,18,164]. Tyrimai rodo, kad vitaminas D slopina T limfocitų pagalbininkų proliferaciją ir susijusių citokinų (IL-12, IFN- γ , IL-6, IL-8, TNF- α ir IL-9) bei Th17 ir Th22 limfocitų gaminamų citokinų išsiskyrimą, bet atvirkščiai – padidina Th2 limfocitų sintezuojamų citokinų atsaką [165]. Vis dėlto, tiesioginis poveikis Th2 limfocitams nėra visiškai aiškus. Tyrimų duomenys rodo, kad sumažėjęs vitamino D kiekis skatina IL-5 bei IL-6 ir IL-8 citokinų, kurie reikšmingai dalyvauja aktyvinant imuninį uždegimą, sekreciją [166]. Be to, vitamino D papildų vartojimas gali būti susijęs su Th17 limfocitų blokavimu [16]. Mokslininkų tyrimai taip pat atskleidė, kad šis vitaminas gali tiesiogiai reguliuoti Th limfocitų aktyvumą, slopindamas citokinų IFN- γ , IL-17, IL-21 ir IL-22 gamybą bei aktyvindamas Foxp3 ir IL-10 išsiskyrimą iš Treg limfocitų [17,167]. Nustatyta, kad vitaminas D slopina efektorinius T limfocitus, o jo trūkumas gali būti susijęs su aktyviu imuniniu uždegimu dėl sutrikusios Th17 ir Treg limfocitų pusiausvyros esant

santykiniam Th17 limfocitų kiekio padidėjimui [168]. Aktyvus vitaminas D slopina uždegimą skatinančių citokinų, tokių kaip IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8 ir IL-12, išskirimą monocituose [169–171]. Taip pat vitaminas D dalyvauja reguliuojant ne tik T limfocitų aktyvumą, bet ir humoralinio imuniteto komponentus [172]. Nustatyta, kad vitaminas D slopina putliųjų ląstelių veiklą, taip slopindamas stromos ląstelių veikimą ir sumažindamas IgE gamybą B limfocituose [172]. Tuo pat metu stromos ląstelės prisideda aktyvinant vitaminą D, kuris toliau slopina IgE sukulto uždegimo mediatorių išsiskyrimą [172]. Be to, kai sumažėja vitamino D kiekis, stromos ląstelės yra reaktyvesnės [172]. Tyrimų duomenys atskleidžia, kad sumažėjęs vitamino D kiekis yra susijęs su padidėjusiu eozinofilų kiekiu kraujyje [173,174] bei IgE kiekiu serume [175–178] astmos ir atopinių ligų metu. Šis vitaminas gali reikšmingai dalyvauti reguliuojant eozinofilų, IgE kiekį. Vitaminas D sumažina eozinofilų nekrozę ir, atitinkamai, antrinę citotoksinių granuliu išsiskyrimą iš eozinofilų audiniuose, taip slopindamas eozinofilų aktyvumą [179]. Be to, epidemiologinių tyrimų duomenys atskleidė, kad vitamino D trūkumas buvo susijęs su padidėjusiu IgE kiekiu astma sergantiems vaikams [180]. Mokslininkų atlikti tyrimai atskleidė Th2 limfocitų sintezuojamų citokinų ir IgE kiekių kitimo priklausomybę nuo vitamino D kiekio [7]. Remiantis tyrimų su pelėmis duomenimis, rodančiais veiksmingą vitamino D poveikį IgE, eozinofilų kiekiui ir Th2 limfocitų aktyvumui, buvo pasiūlyta, kad alergenu specifinė imunoterapija gali būti veiksmingesnė gydant vitamino D papildais [169]. Nors ne visi atlikti tyrimai parodė reikšmingą ryšį tarp vitamino D ir imuninio atsako mechanizmų, tokių kaip IgE ir eozinofilų kiekis [181,182], tačiau pateikti literatūros duomenys atskleidžia svarbų vitamino D vaidmenį reguliuojant imuninės sistemos atsaką atopijos metu. Imuninio atsako ryšys su vitaminu D nėra visiškai išaiškintas ir nėra tiksliai žinoma, kaip vitaminas D veikia atskirus imuninius mechanizmus, susijusius su atopinių ligų vystymusi, todėl reikia atlikti daugiau tyrimų, kurie galėtų pagrįsti šiuos teiginius.

Vitaminas D, moduluodamas įvairius imuninio atsako mechanizmus [157], įskaitant alerginio uždegimo reguliavimą, gali būti susijęs su lengvesne atopinių ligų eiga. Be to, ilgalaikis mažas vitamino D kiekis yra susijęs su padidėjusia uždegiminių plaučių ligų rizika [183]. Manoma, kad vitaminas D slopina nespecifinių imuninių ląstelių diferenciaciją, migraciją ir citokinų gamybą atopijos metu [184]. Keleto tyrimų metu buvo ištirtas ryšys tarp vitamino D trūkumo ir astmos paūmėjimų bei atskleista, kad mažas vitamino D kiekis serume yra reikšmingai susijęs su sunkesne ligos eiga, padidėjusiu kvėpavimo takų uždegimu, susilpnėjusia plaučių funkcija [183,185]. Eksperimentiniai tyrimai su gyvūnais parodė imunomoduliacinį vitamino D ir VDR poveikį slopinant Th2 sukeltą plaučių uždegimą [186]. Australijos mokslininkų tyrimas atskleidė, kad mažas vitamino D kiekis 6 metų amžiaus vaikams

buvo susijęs su padidėjusia alergija ir astma 14 metų amžiaus laikotarpiu, o 25(OH)D koncentracija serume abiejų amžiaus grupių vaikams buvo neigiamai susijusi su tuo pačiu metu pasireiškiančiais alerginiais fenotipais [187]. Skerspjuvio tyrimas, kuriame dalyvavo 100 astma sergančių vaikų, atskleidė neigiamą koreliaciją tarp 25(OH)D ir IgE kiekio tiriamųjų kraujo serume bei odos dūrio testų skaičiaus dėl įsijautrinimo įkvepiamiems alergenams, plaučių funkcijos ir įkvepiamųjų ar geriamųjų kortikosteroidų vartojimo [188]. Norvegijos mokslininkams atlikus atsitiktinės imties stebėjimo tyrimą, trukusį 11 metų, ir įvertinus ryšį tarp 25(OH)D kiekio serume ir alerginio rinito dažnio suaugusiesiems, gauti rezultatai atskleidė reikšmingą ryšį tarp nustatyto sumažėjusio vitamino D kiekio ir padidėjusios alerginio rinito rizikos [189].

In vitro ir *in vivo* tyrimai su gyvūnais parodė, kad vitaminas D dalyvauja AD patogenezėje ir gali prisidėti prie AD etiologijos, gerindamas epidermio barjerą bei didindamas filagrino ekspresiją, aktyvindamas įgimtą imunitetą prieš *S. aureus* bakterijas ir sumažindamas Th2 limfocitų inicijuotą imuninę uždegimą [190,191]. Laboratoriniai tyrimai parodė, kad vitaminas D stimuliuoja antibakterinių peptidų (katelicidino, žmogaus β-defenzino), kurie yra atsakingi už odos infekcijų prevenciją, ekspresiją bei baltymų (filagrino ir kt.), kurie yra būtini odos raginio sluoksnio barjero susidarymui, sintezę [192]. Ypač svarbu tai, kad vitaminas D mažina uždegiminį atsaką ūmioje atopinio dermatito fazėje, slopindamas IL-4 gamybą ir dalyvaudamas didinant antimikrobinių peptidų kiekį [193] bei lėtinės fazės metu slopindamas Th1 limfocitų dauginimąsi ir mažindamas IFN-γ išskyrimą [191]. Dalis tyrimų rezultatų rodo reikšmingas sąsajas tarp vitamino D kiekio kraujyje ir atopinių ligų sunkumo [194–198]. Neigiamą vitamino D trūkumo poveikį atopijos metu patvirtina Italijos mokslininkų skerspjuvio analizės duomenys, atskleidžiantys reikšmingą vitamino D kiekio skirtumą tarp pacientų, sergančių AD, ir sveikų tiriamųjų, vis dėlto reikšmingų skirtumų tarp pacientų, sergančių AA bei rinitu, ir sveikų tiriamųjų rasta nebuvo, tačiau vitamino D lygis kraujyje apskritai buvo mažesnis sergantiesiems atopinėmis ligomis nei kontrolinėje grupėje [197]. Turkijos mokslininkų studija taip pat atskleidė reikšmingą ryšį tarp mažo vitamino D kiekio kraujyje ir AD bei ligos sunkumo [198]. Tyrimai atskleidžia, kad mažesnis vitamino D kiekis kraujyje nustatytas sergant sunkios formos AD, nei pacientams sergantiems lengvu ar vidutinio sunkumo AD [195,198]. Vitamino D trūkumas AD metu taip pat yra susijęs su padidėjusiu jautrumu *Staphylococcus aureus* ir *M. Furfur* sukeliams infekcijoms [195]. Nustatyta, kad asociacijos tarp vitamino D ir AD sunkumo gali būti reikšmingai susijusios su įsijautrinimu maisto ar specifiniams alergenams [196,199]. Vis dėlto yra tyrimų, kuriuose reikšmingas ryšys tarp vitamino D ir AD nenustatytas [200–202].

Vitamino D papildų vartojimas gali būti susijęs su lengvesne atopinių ligų eiga [203], tačiau atliktų tyrimų rezultatai priešaringi [204,205]. Vis dėlto Amerikos tyrėjų atlikto tyrimo rezultatai parodė, kad vitamino D papildai yra susiję su imuninio atsako moduliavimu atopijos metu [193]. Tyrimo metu sergančiųjų AD serume buvo nustatyti didesni Th1 ir Th2 gaminamų citokininų (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ) kiekiai, išskyrus TNF- α , nei sveikiems tiriamiesiems, kurie sudarė kontrolinę grupę [193]. Be to, sergantiesiems AD taip pat nustatytas vitamino D trūkumas ir paskirtas 3 mėnesių laikotarpio vitamino D papildų vartojimo kursas [193]. Įdomu tai, kad po vitamino D vartojimo nustatytas ženklus vitamino D kiekio kraujyje padidėjimas bei padidėjusių citokininų kiekių sumažėjimas, be to, nustatyta reikšminga atvirkštinė koreliacija tarp vitamino D kiekio ir SCORAD indekso [193]. Be to, tyrimo su kūdikiais, sergančiais AD, metu nustatytas reikšmingas ryšys tarp mažo vitamino D kiekio ir padidėjusių IL-4, IL-1717A, IL-22 citokininų kiekio tiriamųjų kraujyje, taip pat atskleistas reikšmingas ryšys tarp SCORAD indekso ir IL-17A, bet ne IL-4 [206]. Tokie rezultatai atskleidžia vitamino D vaidmenį ir jo papildų vartojimo reikšmę atopijos patogenezėje.

1.5. Vieno nukleotido polimorfizmas

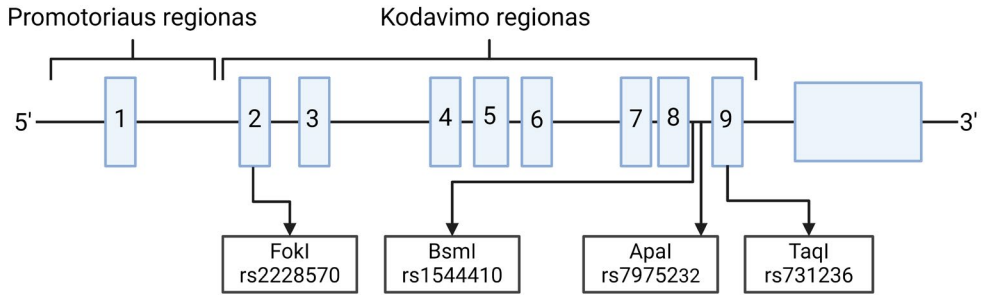
Vieno nukleotido polimorfizmas – VNP (angl. *Single nucleotide polymorphism* – *SNP*) – tai vieno nukleotido skirtumas tikslinėje DNR sekoje. Tai – genetinė variacija, leidžianti aptikti pavienių nukleotidų skirtumus tarp homologinių DNR sekų alelinėse vieno geno formose [207,208]. Pavienių nukleotidų polimorfizmų nustatymas suteikia galimybę identifikuoti žinomo geno alternatyvias alelines ar genotipines formas [207]. VNP laikomas viena labiausiai paplitusia genomo variacija [209–211]. Žmogaus genome yra maždaug 35 000 genų ir bet kurie du organizmo genomai gali skirtis apie 0,1 proc. [212]. Žmogaus genomą sudaro 3,2 bilijonų nukleotidų ir apie 3,5 milijonų VNP variantų, tai reiškia, kad vienas nukleotidas gali skirtis kas 1250 nukleotidų bazių porų [213]. Specifinių VNP nustatymas gali būti naudingas rodiklis diagnozuojant ligas ir vertinant jų rizikos veiksnius.

Kiekvienas žmogaus genomą sudarančių polimorfinių lokusų variantas gali turėti įvairių poveikių, įskaitant tam tikrų genų išraiškos pokyčius, jų funkcionalumą ir sąveiką su kitais biologiniais procesais organizme. Atlikti tyrimai parodė, jog vitamino D apykaitoje veikiančių *VDR* ir *GC* genų VNP gali atlikti reikšmingą vaidmenį reguliuojant vitamino D kiekį organizme [214–218] bei būti susiję su alerginėmis reakcijomis [219–221], įskaitant tokias atopines ligas kaip AD ir AA.

1.5.1. Vitamino D receptoriaus geno polimorfizmas

VDR yra branduoliuose esantis baltymas, kuris veikia kaip ląstelinis signalizavimo elementas ir atlieka svarų vaidmenį aktyvios vitamino D formos (kalcitriolio) prisijungimo prie ląstelių metu bei reguliuojant vitamino D biologinį aktyvumą organizme. Šis receptorių aptinkamas įvairiose kūno ląstelėse, įskaitant kaulų, raumenų, imuninės sistemos ląsteles, tokias kaip neutrofilai, putliosios ląstelės, makrofagai, aktyvūs T ir B limfocitai, taip pat įgimtos limfoidinės ląstelės [222,223]. Toks platus VDR išsidėstymas imuninėse ląstelėse parodo jo galimą svarbą imuninių mechanizmų reguliavime. Nustatyta, kad dėl sumažėjusio vitamino D kiekio organizme ląstelėse padidėja VDR ekspresija ir tai gali būti susiję su uždegimo vystymusi [224]. Tačiau yra prieštaringų duomenų, rodančių, kad mažas vitamino D kiekis yra susijęs su mažesniu VDR aktyvumu ir alerginiu uždegimu [225]. Vis dėlto, tikėtina, kad vitaminas D, sąveikaudamas su VDR, gali dalyvauti moduluojant imuninę pusiausvyrą ir reguliuojant alerginio uždegimo mechanizmus [226].

Vitamino D receptorių koduoja *VDR* genas, esantis 12q13.11 chromosomų srityse bei sudarytas iš aštuonių intronų ir devynių egzonų [227]. *VDR* geno seka yra polimorfiška, joje nustatyta daugiau nei 100 polimorfizmų [228]. Šis genas turi daugiau nei 900 alelinių variantų [215], kurie gali būti reikšmingai susiję su vitamino D funkcija ir dalyvauti reguliuojant vitamino D kiekį organizme. Labiausiai išanalizuoti *VDR* geno VNP yra FokI (rs2228570), BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232) ir TaqI (rs731236). Šie polimorfizmai alternatyviai pavadinti atitinkamų restrikcijos fermentų, naudojamų restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmų analizei, vardu [229]. Tokie *VDR* VNP kaip rs7975232 ir rs1544410 aptinkami aštuntajame *VDR* geno introne [21,228] (1.5.1.1 pav.). Tuo tarpu rs2228570 ir rs731236 VNP randami atitinkamai antrajame ir devintame *VDR* geno egzonuose [21,228] (1.5.1.1 pav.). Polimorfizmai rs7975232, rs1544410 yra susiję su sumažėjusiu mRNR stabilumu ir mažesniu ekspresijos lygiu, o rs2228570 ir rs731236 gali turėti reikšmės baltymo susijungimui ar net struktūrai [21]. Literatūroje pateikiama mažai duomenų apie kitus *VDR* geno polimorfizmus, tokius kaip rs3847987 ar rs11168293. Vis dėlto, yra duomenų rodančių, kad rs3847987 yra reikšmingai susijęs su vitamino D trūkumu [230]. Negalima atmesti galimybės, kad mažiau ištyrinėti *VDR* geno polimorfizmai nėra reikšmingi vitamino D pokyčiams ir neatlieka svarbaus vaidmens atopijos patogenezėje.



1.5.1.1 pav. *Vitamino D receptoriaus geno vieno nukleotido polimorfizmai. (Adaptuota pagal Wjst M. [228])*

Nustatyta, kad VDR reguliuodamas T limfocitų funkcinį aktyvumą gali dalyvauti slopinant T limfocitų dauginimąsi [231] bei prisidėti reguliuojant uždegimą slopinančių citokinų, tokių kaip IL-2 [231,232] ir IFN- γ [233], gamybą; be to, dalyvauti slopinant Th17 išskiriamų citokinų IL-17 ir IL-21 aktyvumą [234]. Manoma, kad VDR aktyvavimas yra susijęs su Th1 ir Th17 susilpnėjusiu atsaku, pereinant prie aktyvesnio priešuždegiminio atsako, kai padidėja T reguliacinių limfocitų kiekis [231]. Be to, nustatyta, kad VDR yra susijęs su mažesniu citotoksinių T limfocitų aktyvumu [234]. Tyrimai su pelėmis atskleidė, kad dėl vitamino D veikimo suaktyvintas VDR gali būti reikšmingai susijęs su padidėjusia Foxp3 ir IL-10 gamyba Treg limfocituose [235,236]. Be to, padidėjęs IgE kiekis ir eozinofilinis uždegimas atopijos metu gali būti susiję su mažesniu vitamino D kiekiu [173], kurį gali sąlygoti VDR veikimas. Mokslininkų rezultatai leidžia teigti, kad vitaminas D, veikdamas per VDR, prailgina eozinofilų gyvavimo trukmę ir padidina membraninių receptorių, kurie slopina jų apoptozę, ekspresiją [24]. Be to, eksperimentinių tyrimų metu nustatytas reikšmingas ryšys tarp VDR ir IgE kiekio, kai AA sergančioms pelėms pašalinus VDR, serume buvo nustatytas didesnis IgE kiekis, nei laukinio tipo pelėms su VDR [23]. Dėl vitamino D trūkumo ir silpnescio VDR signalo gali būti skatinama B limfocitų diferenciacija ir proliferacija, aktyvinama IgE bei IL-13 gamyba [237].

Tam tikri *VDR* geno variantai gali būti reikšmingai susiję su atopinių ligų, tokių kaip AD ar AA sunkumu [9] bei rizika [8,220,238,239]. Atlikta meta-analizė atskleidė, kad *VDR* geno VNP rs7975232, rs1544410 ir rs731236 tam tikrose populiacijose yra susiję su didesniu jautrumu alerginėms ligoms [21]. Be to, kita atlikta meta-analizė parodė reikšmingas sąsajas tarp *VDR* VNP rs1544410 baltiesiems ir *VDR* VNP rs731236 azijiečiams sergantiems astma [21].

Hipotetiškai, atopijos metu nustatomas mažas vitamino D kiekis gali būti susijęs su *VDR* geno polimorfizmu [180,224,236–238]. Pavyzdžiui, Taivano

ir Mongolijos mokslininkai nustatė, kad mažesnė nei 40 ng/ml vitamino D koncentracija plazmoje ir *VDR* geno VNP rs2228570 buvo reikšmingai susiję su astma [8]. Be to, nustatytos sąsajos tarp rs2228570 bei rs3847987 ir sumažėjusio vitamino D kiekio [5, 230]. Nors keli tyrimai su astma ir atopija atskleidė, kad kai kurie *VDR* genotipai yra susiję su astma, bet ne su vitamino D kiekiu [226,239,243].

1.5.2. Vitaminą D surišančio baltymo geno polimorfizmas

Vitaminą D surišantis baltymas, taip pat žinomas kaip GC, VDBP arba GC-globulinas, dalyvauja kraujotakoje pernešant vitamino D metabolitus [244,245]. Tai yra 52–59 kDa molekulinės masės α 2-globulinas, kuris priklauso surišančių baltymų (albumino, alfa-fetoproteino, alfa-albumino/afamino) albuminų superšeimai, kurie yra susiję su riebalų rūgščių arba hormonų transportavimu [244]. Šį baltymą gamina dauguma audinių, tačiau pagrindinis jo šaltinis yra kepenyse [142,244,246]. GC baltymo kiekio reguliavime gali reikšmingai dalyvauti gliukokortikoidai ir uždegimą skatinantys citokinai, bet ne pats vitaminas D [142]. Žinoma, kad GC baltymo gamybą padidina estrogenas [247], todėl padidėjęs jo kiekis kraujyje stebimas nėštumo metu [248] ar vartojant geriamuosius kontraceptikus [249].

GC baltymas turi vieną jungimosi vietą visiems vitamino D metabolitams ir pasižymi dideliu afinitetu 25OHD ir 1,25(OH)2D, todėl atlieka reikšmingą vaidmenį vitamino D apykaitoje, pernešdamas 1,25(OH)2D3 ir 25-hidroksivitaminą D ir reguliuodamas vitamino D metabolitų patekimą į audinius ir ląsteles, kur šie jungiasi su VDR [244]. Dėl sąlyginai didelės šio baltymo koncentracijos plazmoje (0,3–0,5 mg/ml) beveik visos aktyvaus vitamino D formos, cirkuliuojančios kraujyje, yra prisijungusios prie GC [245]. Apie 0,04 proc. šio baltymo kraujyje randama laisvos formos, o jo pusinės eliminacijos laikas yra apie 15 dienų [245]. Tyrimai rodo, kad GC baltymas yra ne tik vitamino D metabolitų nešiklis, bet taip pat dalyvauja uždegiminių procesų reguliavime [142,250]. Žinoma, kad GC taip pat jungiasi prie riebalų rūgščių ir aktino monomerų, dalyvauja leukocitų proteoglikanų ir komplemento C5 sistemos aktyvavime, atlikdamas imunines funkcijas, nepriklausančias nuo vitamino D transportavimo [246].

Tyrimų duomenys rodo, kad GC baltymas gali būti tiesiogiai susijęs su su vitamino D kiekiu [7,250]. Tačiau dalis tyrimų atskleidžia priešingus rezultatus: nustatyta, jog padidėjęs GC baltymo kiekis yra susijęs su vitamino D trūkumu [185,251]. Vis dėlto, GC baltymas gali reikšmingai dalyvauti imuninės sistemos reguliavime, ribodamas vitamino D sąveiką su imuninės sistemos komponentais, tokiais kaip monocitai ar dendritinės ląstelės, ir taip slopinti VDR signalizaciją ląstelėse [148,252] bei kontroliuoti vitamino D metabolitų patekimą į limfocitus [253]. Atsižvelgiant į mokslinių tyrimų duomenis

galima teigti, kad *GC* geno ir kitų vitamino D metabolizme dalyvaujančių genų skirtingi genetiniai variantai gali būti susiję su vitamino D koncentracijos serume reguliavimu [254–256]. Todėl svarbu atkreipti dėmesį ne tik į šio baltymo kiekį kraujyje, bet ir į jo genetinius polimorfizmus, kurie gali būti susiję su *GC* baltymo kiekio reguliavimu.

GC yra polimorfiskiausias žinomas baltymas, kurį koduoja *GC* genas. *GC* genas randamas 4q12-q13 chromosomos srityje, tai 35 kb ilgio genas, sudarytas iš 13 egzonų, koduojančių 474 aminorūgštis [142,244,246]. Labiausiai ištirtinėti *GC* geno polimorfizmai yra rs7041 ir rs4588, esantys *GC* geno vienuoliktame egzone [257]. Tyrimų duomenys atskleidžia, kad šiame gene nustatomi skirtingi polimorfizmai gali būti reikšmingai susiję su baltymo stabilumu ir funkcinėmis savybėmis [142,246]. Skirtingi *GC* geno genetiniai variantai gali turėti įtakos baltymo gebėjimui surišti vitaminą D ir jį transportuoti į ląsteles [257]. Powe ir kt. atliktas tyrimas su juodaodžiais amerikiečiais atskleidė reikšmingas sąsajas tarp *GC* geno VNP rs7041 alelio T ir sumažėjusio *GC* baltymo bei vitamino D kiekio [256]. Taip pat pastebėta, kad skirtingi *GC* geno variantai gali būti susiję su individualiu gebėjimu įsisavinti vitaminą D, o tam tikri geno polimorfizmai gali būti susiję su didesnėmis ar mažesnėmis vitamino D koncentracijomis kraujyje [257]. Pavyzdžiui, Perna ir bendraautorių atliktame tyrime nustatyta neigiama koreliacija tarp tam tikrų *GC* geno polimorfizmų alelių (rs4588 (C > A), rs2282679 (A > C) arba rs1155563 (T > C)) ir vitamino D kiekio, reikšmingi skirtumai dažniausiai nustatyti vasaros laikotarpiu [255]. Tokie rezultatai rodo, kad genetiniai skirtumai gali būti susiję su vitamino D kiekio svyravimais ir atsaku į saulės poveikį [255]. Pastebėta, kad tam tikri *GC* geno variantai yra reikšmingai susiję su vitamino D kiekiu skirtingose etninėse grupėse, tokiose kaip Kuveito arabai ir Pietų Azijos gyventojai [258]. Vokietijos mokslininkų atlikto tyrimo metu nustatytas reikšmingas ryšys tarp *GC* geno polimorfizmų rs222040, rs7041 ir vitamino D bei IgE kiekio sergant astma [22], atskleidžiant *GC* geno VNP vaidmenį imuninių mechanizmų reguliavime. Tokie duomenys rodo, kad *GC* geno polimorfizmai gali būti reikšmingi alergenu sukkelto uždegimo metu ir atlikti svarų vaidmenį atopinių ligų patogenezėje. Vis dėlto, ne visi *GC* geno polimorfizmai yra išsamiai išanalizuoti. Mokslininkai pateikia duomenų įrodančių, kad *GC* geno VNP rs3733359 yra reikšmingai susijęs su plaučių infekcijomis [259], tačiau neaiškus šio polimorfizmo ryšys su vitamino D kiekiu ir atopinėmis ligomis, taip pat nėra aiškus kitų *GC* geno polimorfizmų vaidmuo.

Taigi, vitaminas D ir jo metabolizme svarbų vaidmenį atliekančių *VDR* bei *GC* genų įvairūs polimorfizmai gali būti reikšmingi reguliuojant imuninio atsako komponentų raišką atopijos metu.

2. METODAI

Tyrimas vykdytas 2020–2024 m. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto (LSMU) Medicinos akademijos (MA) Imunologijos ir alergologijos klinikoje, gavus Regioninio biomedicininį tyrimų etikos komiteto leidimą Nr. BE-2-74 (1 priedas ir 2 priedas).

Dalis tyrimo duomenų buvo surinkti vykdant tarptautinį projektą „Vitamino D ir jo receptorių genų polimorfizmą palyginamasis tyrimas tarp Lietuvos, Latvijos ir Taivano vaikų ir suaugusiųjų, sergančių atopiniu dermatitu ir astma“. Buvo gauti užsienio partnerių sutikimai naudotis Lietuvos mokslininkų surinktais projekto duomenimis (3 priedas ir 4 priedas).

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, vitamino D receptoriaus geno ir vitamino D surišančio baltymo geno polimorfizmai bei bendro IgE ir eozinofilų kiekis kraujyje.

Antrame tyrimo etape, parinkus statistinius metodus ir suformavus proporcingas grupes, daliai tiriamųjų įvertintas imuninio atsako žymenų kiekis (T limfocitų ir jiems būdingų citokinų profilis).

2.1. Tyrimo imtis

Sergančių atopinėmis ligomis grupę sudarė 185 pacientai, sergantys lengvu ar vidutinio sunkumo atopiniu dermatitu bei lengva ar vidutinio sunkumo alergine astma, kurie 2020 m. rugsėjo – 2023 m. balandžio mėn. laikotarpiu buvo tirti ir konsultuoti LSMU ligoninės Kauno klinikų Imunologijos ir alergologijos klinikoje. AD diagnozė nustatyta vadovaujantis Hanifino ir Rajkos kriterijais [260], kai ligos sunkumas įvertintas naudojant SCORAD (angl. *SCORing Atopic Dermatitis*) indeksą. AA sergantys asmenys buvo diagnozuojami ir klasifikuojami pagal Pasaulinės astmos iniciatyvos (GINA, angl. *Global Initiative for Asthma*) rekomendacijas [261]. Įsijautrinimas alergenams nustatytas pagal EAACI rekomendacijas [262]. Kontrolinę grupę sudarė 81 sveikas asmuo, kurie nebuvo įsijautrinę alergenams, nesergantys atopinėmis ligomis ar kitomis ligomis, kurios gali paveikti tyrimo rezultatus.

Bendrieji įtraukimo kriterijai:

- vyresni nei 18 metų asmenys,
- mažiausiai tris mėnesius nevartojantys vitamino D papildų,
- nesergantys ūminės ar lėtinės kvėpavimo takų ligos (išskyrus astmą),
- nesergantys sisteminės autoimuninės ar piktybinėmis ligomis.

Papildomi įtraukimo kriterijai kontrolinei grupei:

- Nėra pasireiškiančių alergijos simptomų.

Bendrieji atmetimo kriterijai:

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

Visi asmenys, sutikę dalyvauti, buvo supažindinti su mokslinio tyrimo protokolu ir pasirašė informuoto asmens formą.

2.2. Mėginių rinkimas ir saugojimas

Mėginiai tyrimams iš tiriamųjų surinkti atliekant venos punkciją. Bendro kraujo vertinimui bei *VDR* ir *GC* genų vieno nukleotido polimorfizmui nustatyti kraujas buvo surinktas į mėgintuvėlius su antikoagulantu kalio etileno-diamino-tetra-acto rūgštimi (K2EDTA), mėgintuvėliai genetinių tyrimų atlikimui buvo užšaldyti $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki tyrimo atlikimo. Mėginiai uždegimą skatinančių ir slopinančių citokinų vertinimui bei bendrojo IgE ir vitamino D kiekio kraujyje nustatymui buvo surinkti į mėgintuvėlius be priedų, kurie buvo centrifuguojami 3500 aps./min. greičiu 10 min., o serumas atskirtas ir užšaldytas $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki laboratorinių tyrimų atlikimo. T limfocitų profilio analizei tiriamųjų kraujas surinktas į mėgintuvėlius su ličio heparinu be gelio, tyrimai atlikti iš surinkto kraujo mėginių, nešaldant.

2.3. Periferinio kraujo vertinimas

Bendras kraujo tyrimas ir atskirų leukocitų populiacijų vertinimas atliktas automatinio hematologiniu analizatoriumi UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System (Beckman Coulter, Majamis, JAV) LSMU Ligoninės Kauno klinikų Laboratorinės medicinos klinikoje.

2.4. Vitamino D ir bendro IgE koncentracijos serume vertinimas

Vitamino D kiekis tiriamųjų kraujyje nustatytas išmatavus 25(OH)D koncentraciją serume imunofermentinės analizės – ELISA (angl. *enzyme linked immunosorbent assay*) metodu pagal standartizuotą gamintojo metodiką, naudojant komercinius reagentų rinkinius (BioVendor, Brno, Čekija). Analizės tikslumo kintamumo koeficientai tyrimo metu buvo 20 proc. Tyrimo jautrumas 2,81 ng/ml. Remiantis gamintojo rekomendacijomis, Tarptautinės endokrinologų draugijos gairėmis [152,263] ir literatūros šaltiniais [151,153,264], duomenų analizė buvo atlikta atsižvelgiant į vitamino D kiekį: trūkumas $< 20\text{ ng/ml}$ ($< 50\text{ nmol/l}$), nepakankamumas 20–30 ng/ml (50–75 nmol/l), normalus 30–50 ng/ml (75–125 nmol/l).

Bendro IgE kiekio serume matavimai buvo atlikti ELISA metodu, naudojant komercinį rinkinį (IBL International, Hamburgas, Vokietija). Analizės

tikslumo kintamumo koeficientai tyrimo metu buvo 4,1 proc. Tyrimo jautrumas 0,8 kU/l. Bendro IgE koncentracijos kraujo serume padidėjimas suaugusiems tiriamiesiems apibrėžtas, jei gauti rezultatai viršijo gamintojo nurodytas ribas – 100 IU/ml [265].

2.5. Genų vieno nukleotido polimorfizmo nustatymas

VDR ir *GC* genų vieno nukleotido polimorfizmo analizei iš tiriamųjų periferinio kraujo buvo išskirta DNR. DNR išskyrimas atliktas naudojant QIAamp DNR kraujo mini rinkinį (Qiagen, Hildenas, Vokietija), vadovaujantis gamintojo pateiktomis instrukcijomis. Naudojant TaqMan vieno nukleotidų genotipavimo tyrimo zondus (Thermo Fisher Scientific, San Diegas, JAV) buvo išanalizuoti šeši pavienių nukleotidų polimorfizmai *VDR* gene (rs7975232, rs1544410, rs731236, rs3847987, rs2228570, rs11168293) ir keturi *GC* gene (rs4588, rs7041, rs4725, rs3733359). Vadovaujantis gamintojo pateiktomis metodinėmis instrukcijomis, tyrimai atlikti LSMU, Medicinos akademijos, Genetikos ir molekulinės medicinos klinikoje.

2.6. Uždegimą skatinančių ir uždegimą slopinančių citokinų vertinimas

IL-5, IFN- γ , IL-17A, IL-10, TGF- β 1, IL-35 ir IL-33 matavimai serume atlikti ELISA metodu, naudojant komercinius rinkinius (Elabscience Biotechnology Inc., Hiustonas, JAV) su Euroimmun Analyzer I (Liubekas, Vokietija).

IL-5, IFN- γ , IL-17A, IL-10, TGF- β 1, IL-35 ir IL-33 matavimai atlikti naudojant ELISA rinkinius, sudarytus iš plokštelių su 96 šulinėliais, padengtais specifiniais antikūnais prieš atitinkamus žmogaus antikūnus. Antriniai antikūnai buvo žymėti biotinu, o konjugatas – streptavidinas-HRP.

Prieš tyrimą užšaldyti mėginiai atšildyti kambario temperatūroje ir nacentrifuguoti, kad būtų pašalintos nuosėdos. Rinkinių reagentai sušildyti kambario temperatūroje ir paruošti pagal gamintojo rekomendacijas. TGF- β 1 mėginiuose paprastai būna neaktyvios formos, todėl prieš tyrimą buvo aktyvuotas naudojant rinkinyje esančius aktyvacijos reagentus (1M HCl ir 1,2M NaOH/0,5 M HEPES).

Tyrimų matavimų jautrumas buvo: IL-5 – 9,38 ng/ml, IFN- γ – 9,38 ng/ml, IL-17A – 18,75 ng/ml, IL-10 – 0,94 ng/ml, TGF- β 1 – 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 \pm 2 nm. Analizės tikslumo kintamumo koeficientai tyrimo metu buvo < 10 proc. TGF- β 1 kiekis serume buvo matuojamas ng/ml, kiti citokinai buvo matuojami pg/ml.

2.7. Imuninių ląstelių – T limfocitų potipių analizė

Į mėgintuvėlius su ličio heparinu, be gelio buvo paimtas periferinis kraujas. Siekiant užtikrinti ląstelių gyvybingumą iš periferinio kraujo, nedelsiant buvo išskiriamos mononuklearinės ląstelės. Išskyrus mononuklearines ląsteles, atliktas Th1, Th2, Th17 ir Treg limfocitų paruošimas analizei tėkmės citometrijos metodu.

2.7.1. Mononuklearinių ląstelių išskyrimas iš periferinio kraujo

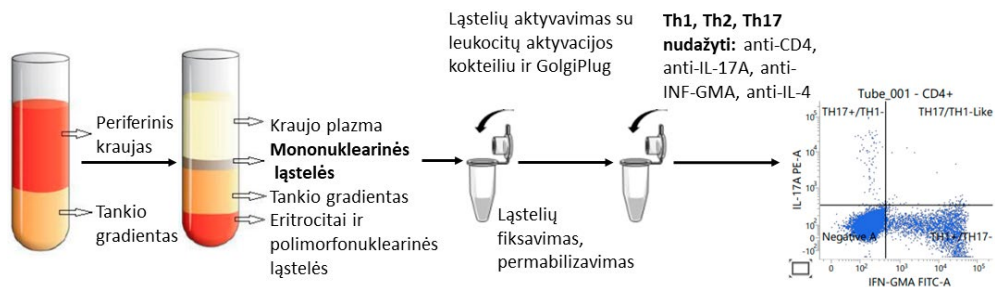
Th1, Th2, Th17 limfocitų įvertinimui buvo išskirtos periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės (PBMC). Periferinis kraujas buvo praskiedžiamas su fiziologiniu tirpalu tirpalu lygiomis dalimis (2 ml kraujo su 2 ml fiziologinio tirpalo). Į 50 ml Falcon tipo mėgintuvėlius (Thermo Fisher Scientific™, Masačiusetas, JAV) po 4 ml. buvo išpilstomas aukšto tankio gradientas (Ficoll Paque™; Amersham Biosciences AB, Upsala, Švedija), o ant gradiento paviršiaus švelniai užpilamas periferinis kraujas, lygiomis dalimis praskiestas su fiziologiniu tirpalu.

Paruoštas mėginys buvo centrifuguojamas $400 \times g$ greičiu, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min., nenaudojant centrifugos stabdymo. Po centrifugavimo susidaręs viršutinis frakcionuotas sluoksnis, kuriame išsidėstė mononuklearinės ląstelės, švelniai atskirtas surenkant sterilia pastero pipete ir vengiant susidariusių sluoksnių susimaišymo. Surinktas PBMC sluoksnis buvo perkeliamas į sterilų centrifuginį mėgintuvėlį, siekiant pašalinti trombocitus ir tankio gradiento likučius, atliktas ląstelių plovimas. Plovimo metu surinktos ląstelės suspenduotos 2–3 ml fosfatinio buferio druskų tirpale (PBS, BD Biosciences, San Diegas, JAV) ir centrifuguotos $100 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min. Po centrifugavimo susidaręs supernatantas buvo pašalinamas, o ląstelės pakartotinai suspenduotos 2–3 ml ląstelių auginimo terpėje RPMI 1640 compleet (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Masačiusetas, JAV) ir atliktas pakartotinis centrifugavimas $100 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min. Po centrifugavimo supernatantas buvo pašalinamas. Šviesiniu mikroskopu suskaičiuotas ląstelių kiekis suspensijoje, tiriamuosius mėginius sudarė apie $1 \times 10^6/\text{ml}$ ląstelių.

Treg limfocitų vertinimui PBMC iširtos naudojant hipotononį lizavimo tirpalą (BD FACS Lysing Solution, BD Biosciences, San Diegas, JAV), kai lizės metu pašalinti eritrocitai. 100 μl periferinio kraujo buvo sumaišyta su 1 ml lizavimo tirpalo ir laikoma kambario temperatūroje tamsoje 10–15 min., kol aiškiai matoma eritrocitų lizė.

2.7.2. T limfocitų paruošimas

Mėginio paruošimas Th1, Th2, Th17 limfocitų nustatymui schematiškai pavaizduotas 2.7.2.1 paveiksle. Aktyvūs T limfocitų potipiai nustatyti pagal jų gaminamus specifinius citokinus, todėl buvo svarbus tinkamas ląstelių populiacijų aktyvavimas. Siekiant sukelti dominančio citokino gamybą, iš periferinio kraujo išskirtos mononuklearinės ląstelės buvo stimuliuotos naudojant T ląstelių aktyvacijos kokteilį su jonomicinu ir baltymų išskyrimą iš ląstelių slopinančiu GolgiPlug reagentu (Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPluG™, BD Biosciences, San Diego, JAV). Ląstelių suspensija buvo užpilama 1 ml ląstelių augimo terpės RPMI 1640 complete, sumaišytos su karščiu aktyvuotu jaučio serumo albuminu (BSA) ir streptomycinu (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Masačiusetas, JAV) bei pridėjus 2 μ l leukocitų aktyvacijos reagento inkubuojama 37 °C, 4 val. Taip buvo aktyvuojama specifinių citokinų gamyba ir jų kaupimasis limfocituose, sustabdant jų patekimą į aplinką dėl baltymų išsiskyrimą iš ląstelių slopinančio reagento veikimo. Po inkubacijos su ląstelių aktyvacijos reagentu, atliktas plovimas: ląstelės buvo nucentrifuguojamos 250 \times g greičiu, 20 °C, 10 min., susidaręs supernatantas nupiltas, ląstelės suspenduotos 2 ml ląstelių augimo terpės RPMI 1640 complete ir nucentrifuguotos 250 \times g greičiu, 20 °C, 10 min. Plovimo veiksmas atliktas du kartus.



2.7.2.1 pav. Mėginio paruošimas Th1, Th2, Th17 limfocitų nustatymui tėkmės citometrijos metodu

Po ląstelių aktyvavimo dėl intraląstelinio dažymo ląstelės fiksuotos ir permabilizuotos; viduląstelinio komponentų vertinimui tai – būtini etapai. Fiksavimo metu buvo stabilizuojama ląstelės struktūra ir užfiksuojamas jos turinys. Taigi, gauta ląstelių suspensija buvo užpilama 1 ml ląstelių fiksavimo buferiu (BD Cytotfix™, BD Biosciences, San Diego, JAV) ir laikoma kambario temperatūroje, tamsoje, 15 min. Po fiksacijos ląstelių suspensija buvo centrifuguojama 250 \times g greičiu, 20 °C, 10 min., susidaręs supernatantas nupiltas. Du kartus ląstelės buvo užpilamos 2 ml FBS dažymo buferiu (FBS

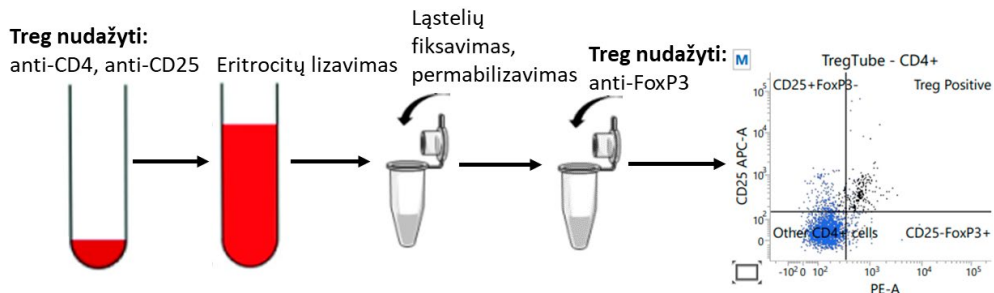
Stain buffer, BD Biosciences, San Diegas, JAV) ir centrifuguojamos 250 × g greičiu, 20 °C, 10 min. Fiksuotos ir nuplaautos ląstelės buvo suspenduojamos 1 ml permabilizavimo / plovimo buferio (BD Perm/Wash™, BD Biosciences, San Diegas, JAV) ir laikomos kambario temperatūroje, tamsoje, 15 min. Vėliau ląstelių suspensija buvo centrifuguojama 250 × g greičiu, 20 °C, 10 min., supernatantas buvo nupiltas, o ląstelės suspenduotos 50 μl permabilizavimo buferio. Ląstelių permabilizavimas padidino ląstelių membranos pralaidumą, suteikiant galimybę antikūnams patekti į ląstelės vidų ir pažymėti jos viduje esančius baltymus.

Aktyvuotų ląstelių populiacijos nudažytos su fluorochromu žymėtais monokloniniais antikūnais: anti-CD4-PerCP-Cy5.5, anti-IL-17A-PE, IFN-GMA-FITC, IL-4 APC (Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit, BD Biosciences, San Diegas, JAV), į suspensiją pridedant po 20 μl antikūnų mišinio ir inkubuojant kambario temperatūroje tamsoje, 30 min. Prieš analizę tėkmės citometru ląstelių suspensija buvo du kartus nuplaunama, užpilant 1 ml permabilizavimo / plovimo buferio, ir nucentrifuguota 250 x g greičiu, 20 °C, 10 min., pašalinant supernatantą. Po to ląstelės buvo suspenduotos 50 μl FBS dažymo buferio. Anti-CD4 buvo pažymėti ląstelės paviršiaus žymenys, kurie leido nustatyti T limfocitų pagalbininkų populiacijas (CD4+), kiti atitinkamu fluorochromu žymėti antikūnai padėjo įvertinti T limfocitų pagalbininkų potipius pagal jų gaminamus viduląstelinius baltymus.

Atliekant aktyvuotų ląstelių dažymą fluorochromu žymėtais antikūnais Th1, Th2, Th17 populiacijų vertinimui, lygiagrečiai buvo atliekama neigiama mėginio kontrolė. Kontroliniai mėginiai buvo ruošiami kaip tiriamasis mėginys, atliekant tiriamų ląstelių suspensijos dažymą trijų spalvų izotipiniu kokteiliu (BD Biosciences, San Diegas, JAV), susidedančiu iš žmogaus antikūnų CD4-PerCP-Cy, pelės anti-mIgG1-FITC, pelės anti- mIgG1-PE, žiurkės anti- mIgG1-FITC. Neigiama mėginio kontrolė skirta įvertinti nespecifinį dažymąsi fluorescenciniais antikūnais, nukreiptais prieš ląstelinius antigenus, esančius tiksliniuose CD4+ limfocituose, kurie buvo fiksuoti ir permabilizuoti. Žinoma, kad nespecifinis dažymas fluorescenciniais antikūnais gali atsirasti dėl nespecifinio imunoglobulino ir / arba fluorochromo sukkelto prisijungimo prie ląstelių molekulių, įskaitant imunoglobulino Fc receptorius.

Mėginio paruošimas Treg limfocitų analizei schematiškai pavaizduotas 2.7.2.2 paveiksle. Treg ląstelių analizei 100 μl periferinio kraujo buvo sumaišyta su 20 μl fluorochromais žymėtais monokloniniais antikūnais, skirtais ląstelės paviršiaus žymenų nustatymui: anti-CD4-FITC ir anti-CD25-APC (BD Biosciences, San Diegas, JAV). Tiriamasis kraujas su antikūnais laikytas kambario temperatūroje, tamsoje, 20 min. Po inkubacijos ląstelių suspensija sumaišyta su 1 ml hipotoninio lizavimo tirpalo (BD FASCS Lysing Solution, BD Biosciences, San Diegas, JAV) ir laikyta kambario temperatūroje, tam-

soje, 20 min. Po to ląstelės nucentrifuguotos $500 \times g$, 10 min. greičiu, supernatantas nupiltas. Siekiant pašalinti lizavimo liekanas, ląstelės sumaišytos su 2 ml FBS dažymo buferio (FBS stain buffer, BD Biosciences, San Diego, JAV) ir pakartotinai nucentrifuguotos $500 \times g$, $20^\circ C$, 5 min, supernatantas nupiltas.



2.7.2.2 pav. Mėginio paruošimas Treg limfocitų analizei tėkmės citometrijos metodu

Po lizavimo ir plovimo ląstelės buvo fiksuotos 1 ml žmogaus FoxP3 buferio A (Human FoxP3 Buffer Set, BD Biosciences, San Diego, JAV), kambario temperatūroje, tamsoje, 10 min. Po fiksavimo, siekiant pašalinti fiksavimo buferį, ląstelės nuplautos du kartus, suspensiją sumaišant su 2 ml FBS dažymo buferio ir centrifuguojant $500 \times g$, $20^\circ C$, 5 min., supernatantas nupiltas.

Švelniai suspendavus ląsteles likusiame supernatanto tūryje, atliktas ląstelių permabilizavimas įpilant 0,5 ml žmogaus FoxP3 buferio tirpalo (Human FoxP3 Buffer Set, BD Biosciences, San Diego, JAV) ir laikant kambario temperatūroje, tamsoje, 30 min. Po inkubacijos ląstelės nuplautos du kartus, suspensiją sumaišant su 2 ml FBS dažymo buferio ir centrifuguojant $500 \times g$, $20^\circ C$, 5 min., supernatantas nupiltas.

Ląstelės nudažytos fluorochromu PE pažymėtu FoxP3 antikūnu (BD Biosciences, San Diego, JAV), skirtu nustatyti ląstelės branduolio viduje esantį FoxP3 žymenį, į suspensiją pridodant po 20 μl anti-FoxP3 ir inkubuojant kambario temperatūroje, tamsoje, 30 min. Po inkubacijos ląstelės nuplautos du kartus, suspensiją sumaišant su 2 ml FBS dažymo buferio ir centrifuguojant $500 \times g$, $20^\circ C$, 5 min., po to pašalinant supernatantą ir ląsteles švelniai suspenduojant 50 μl FBS dažymo buferio.

2.7.3. Limfocitų fenotipo vertinimas tėkmės citometrijos metodu

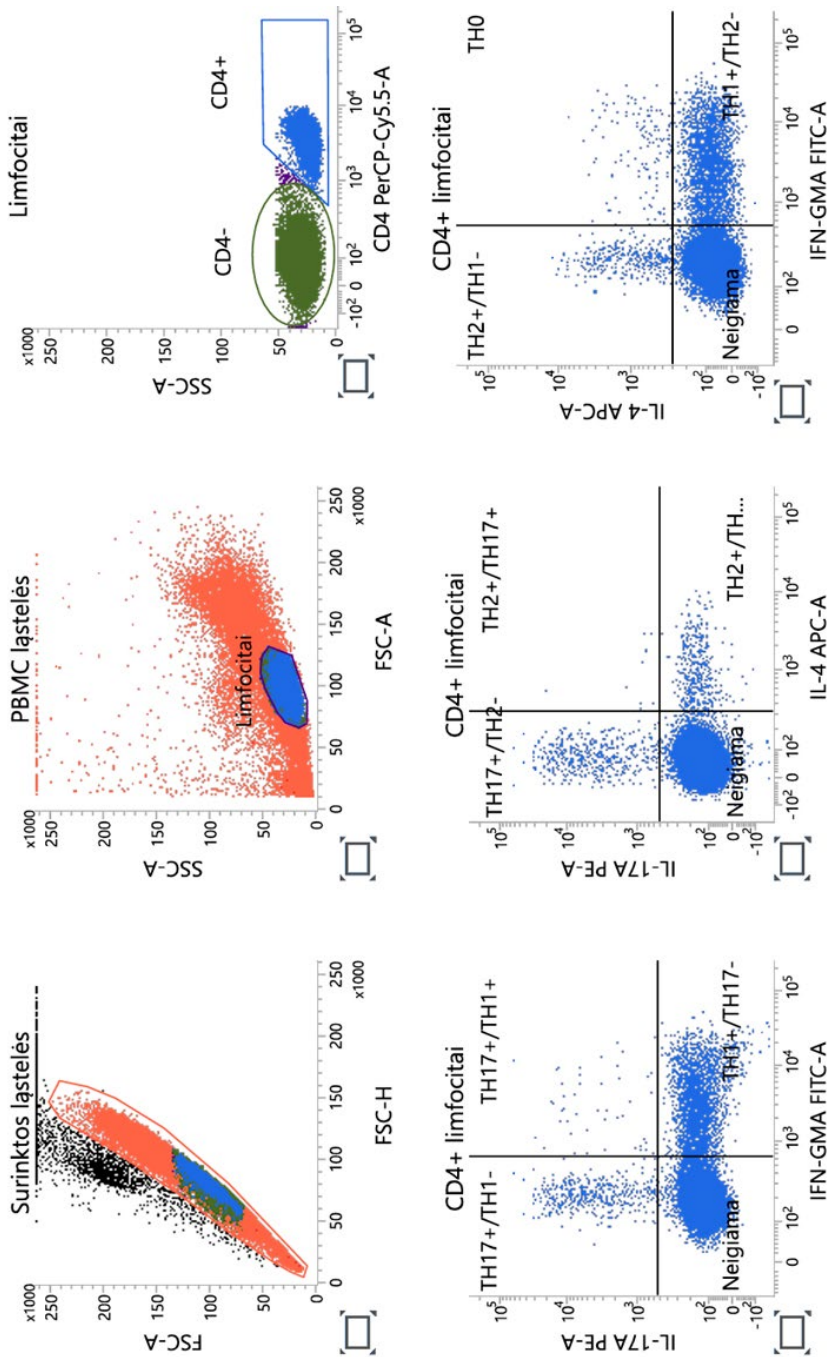
T limfocitų populiacijų nustatymas atliktas tėkmės citometrijos metodu, panaudojant tiesioginę imunofluorescenciją. Fluorochromais žymėtos ląstelės hidrofokusuojamos ir leidžiant pro agarą lazerį skleidžia skirtingų bangos

ilgių šviesą, pagal tiesinę (koreliuoja su ląstelės dydžiu) ir šoninę (koreliuoja su ląstelės grūdėtumu) lazerio šviesos sklaidą bei sužadintų fluorochromų šviesos intensyvumą – ląstelių išsidėstymas atvaizduojamas sketerogramose.

Pagal analizatoriaus naudojimo instrukcijas, prieš tyrimų praleidimą atliktos darbo patikros kontrolės. Užtikrinant tyrimų vidaus kontrolę, pagal poreikį atlikta kompensacija, naudojant „BD™ FC beads 7-color kit“ ir „BD™ FC beads 5-color kit“ kompensatorių rinkinius (BD Biosciences, San Diegas, JAV), ir techninė kalibracija, naudojant aparato kontrolės reagentą „BD™ CS&T Beads“ (BD Biosciences, San Diegas, JAV). Tinkama citometro kompensacija ir kalibracija svarbu kontroliuojant pasiekiamų parametrų fotodaugintuvo jautrumą, fluorescencijos kompensavimą, teigiamo bei neigiamo signalo atskyrimo vertes bei lazerių lygiavimą.

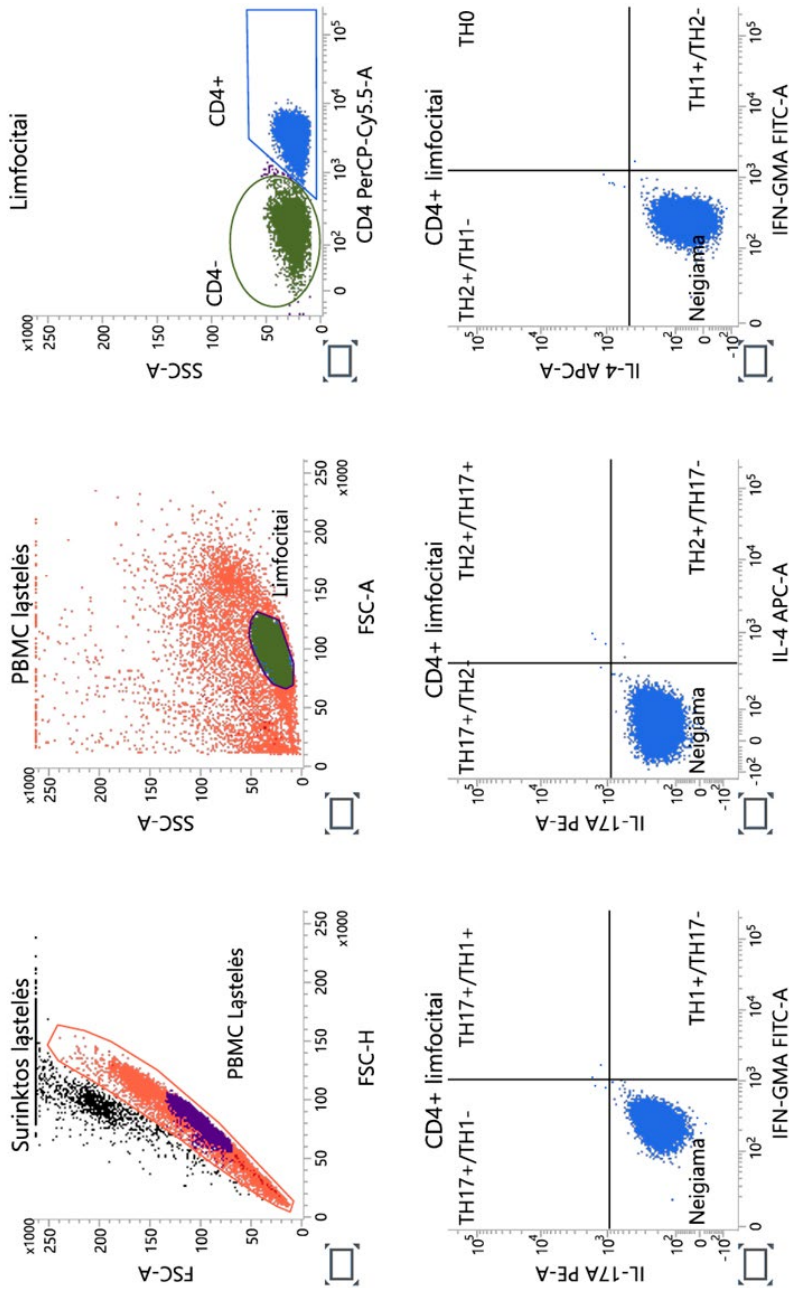
Paruoštų mėginių analizė atlikta tėkmės citometrijos analizatoriumi BD FACSLytic™ (BD Biosciences, San Diegas, JAV), naudojant „BD FAC Suite™“ programą v1.2.1 (BD Biosciences, San Diegas, JAV). Limfocitų potipių analizė atlikta nusibrėžiant skirtingų potipių ribas, kurios nustatytos atsižvelgiant į limfocitų populiacijos apibrėžimą pagal lazerio šviesos šoninės ir tiesinės sklaidos profilį bei fluorochromu žymėtais monokloniniais antikūnais dažytų mėginių signalo intensyvumą. Atliktų tyrimų metu nustatyti aktyvių T limfocitų potipiai Th1, Th2, Th17 (2.7.3.1 pav.), lygiagrečiai vertinant kontrolinį mėginį (2.7.3.2 pav.) ir aktyvių Treg limfocitų (2.7.3.3 pav.) kiekis tiriamųjų periferiniame kraujyje.

Gauti rezultatai išreikšti procentais nuo iš periferinio kraujo išskirtų mononuklearinių ląstelių.



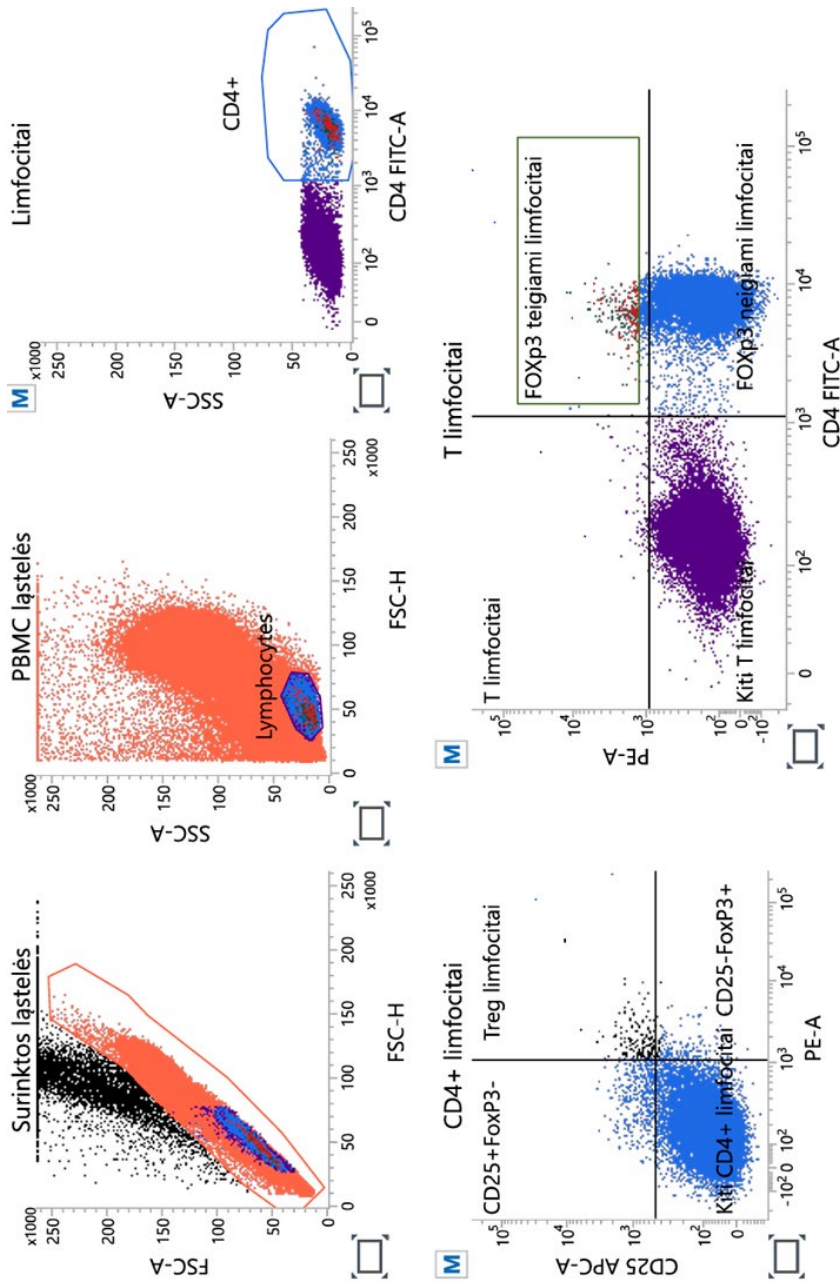
2.7.3.1 pav. Th1, Th2, Th17 limfocitų vertinimas tėkmės citometrijos metodu

Išskyrus periferinio kraujo mononuklearines ląsteles (PBMC), ląstelėse esantys limfocitai buvo aktyvuoti, fiksuoti ir permabilizuoti, vėliau nu-
dažyti anti-CD4-FITC, anti-IL-17A-PE, anti-IFN-GMA-FITC, anti-IL-4-APC. Paruoštas mėginys įvertintas tėkmės citometrijos metodu. Pagal
lazerio šviesos šoninės ir tiesinės sklaidos profilių bei fluorochromu žymėtai antikūnais (anti-CD4-FITC) dažytų mėginių signalo intensyvumą
buvo sudarytos taškinės diagramos ir apibrėžta CD4+ limfocitų populiacija. Išskirtoje CD4+ populiacijoje pagal fluorochromu žymėtų antikū-
nų anti-IL-17A-PE, IFN-GMA-FITC, IL-4-APC signalo intensyvumą įvertintos aktyvių Th1, Th2, Th17 limfocitų populiacijos.



2.7.3.2 pav. Th1, Th2, Th17 limfocitų vertinimas tėkmės citometrijos metodu, neigiama mėginio kontrolė

Išskyrus iš periferinio kraujo mononuklearines ląsteles (PBMC) ir atliekant Th1, Th2, Th17 aktyvių T limfocitų vertinimą tėkmės citometrijos metodu, lygiagrečiai buvo atliekama neigiama mėginio kontrolė. Tiriamas mėginys buvo nudažytas trijų spalvų izotipiniu kokteiliu, susidedančiu iš žmogaus antikūnų CD4-PerCP-Cy, pelės anti-mIgG1-FITC, pelės anti-mIgG1-PE, žiurkės anti-mIgG1-FITC. Paruoštas mėginys ivertintas tėkmės citometrijos metodu. Pagal lazerio šviesos šoninės ir tiesinės sklaidos profilį bei fluorochromu žymėtais antikūnais (anti-CD4-PerCP-Cy) dažytų mėginių signalo intensyvumą buvo sudarytos taškinės diagramos ir apibrėžta CD4+ limfocitų populiacija, atitinkamai ivertintos kitos aktyvių limfocitų pagalbininkų populiacijos. Vertinant neigiamą mėginio kontrolę neaptinkama nespecifiinio dažymosi fluorescensiniais antikūnais, nukreiptais prieš ląstelinius antigenus, esančius tiksliniuose CD4+ limfocituose, aktyvių Th1, Th2 ir Th17 limfocitų populiacijų nebuvo stebima.



2.7.3.3 pav. Treg limfocitų vertinimas tėkmės citometrijos metodu

Išskyrus periferinio kraujo mononuklearines ląsteles (PBMC) ir suspensijoje esančius limfocitus nudažius anti-CD4-FITC bei anti-CD25-APC, buvo atliktas ląstelių fiksavimas ir permabilizavimas, vėliau limfocitai nudažyti anti-FoxP3-PE. Paruoštas mėginys įvertintas tėkmės citometrijos metodu. Pagal lazerio šviesos šonines ir tiesines sklaidos profilių bei fluorochromu žymėtai antikūnais (anti-CD4-FITC) dažytų mėginių signalo intensyvumą buvo sudarytos taškinės diagramos ir apibrėžta CD4+ limfocitų populiacija. Išskirtoje CD4+ populiacijoje pagal fluorochromu žymėtų antikūnų anti-CD25-APC ir anti-FoxP3-PE signalo intensyvumą atitinkamai įvertintos aktyvių Treg limfocitų populiacijos, kurios pasižymėjo CD25+ ir/arba FoxP3+ žymenų ekspresija, teigiama Treg limfocitų populiacija vertinta esant CD25+ ir FoxP3+ ekspresijai.

2.8. Imties dydis ir statistinė analizė

Imties dydis buvo įvertintas remiantis pilotinio tyrimo duomenimis (minimalus reikiamų tiriamųjų skaičius – 30), naudojant standartizuotą imties dydžio skaičiavimo formulę:

$$n = \frac{z^2 v (1 - v)}{\Delta^2}$$

Pilotinis tyrimas buvo atliktas įtraukiant 63 tiriamuosius, sergančius astma, ir 32 sveikus tiriamuosius. Remiantis literatūros duomenimis, įvertinta, kad astmos ir atopinio dermatito paplitimas Lietuvos populiacijoje yra apie 20 proc. [266,267]. n – mažiausia tiriamoji grupė, v – ligos paplitimas (0,02), z – normaliojo skirstinio kvantilis $N(0,1) \frac{1+P}{2}$ (1,96), Δ – tikimybės įvertis (0,05):

$$n = \frac{1,96^2 \times 0,02(1 - 0,02)}{0,05^2} = 30$$

Pritaikius pateiktą formulę, gauti rezultatai rodo, kad vertinant tiriamuosius, sergančius astma ir atopiniu dermatitu, tiriamoji imtis neturėtų būti mažesnė nei 30 tiriamųjų, sergančių atopinėmis ligomis.

Duomenims analizuoti buvo naudotos statistinės analizės IBM SPSS Statistics 29 versija (IBM, JAV) ir Microsoft Excel 2017 (Microsoft corporation, JAV) programos. Aprašomoji statistika kiekybiniais duomenimis pateikiama vidurkiais ir standartine vidurkio paklaida (SEM), kokybiniais – dažniais ir santykiniais dažniais (proc.). Kiekybinių duomenų pasiskirstymo pagal normalųjį dėsnį prielaida buvo tikrinama naudojant Šapiro ir Vilko (ShapiroWilk) testą. Tiesiniams ryšiams tarp kiekybinių kintamųjų nustatyti buvo skaičiuoti Spirmeno (Spearman) koreliacijos koeficientai (r). Koreliacija buvo vertinta kaip silpna, jei r mažesnis už 0,3; vidutinė – jei r reikšmės pateko į intervalą 0,3–0,75; stipri – jei r priklausė intervalui $> 0,75$. Kategoriniams duomenims įvertinti taikytas χ^2 (Chi-kvadratas), esant mažai imčiai – tikslusis Fisher testas. Dviejų grupių intervalinių kintamųjų vidurkių skirtumai palyginti, atsižvelgiant į Stjudento (Student) t kriterijų; jei netenkinta skirstinių normalumo prielaida – Mano ir Vitnio U (Mann-Whitney) kriterijų. Trijų grupių vidurkiai ir jų dispersijos buvo lygintos panaudojant vienfaktorinę dispersinę analizę (ANOVA); esant reikšmingiems skirtumams tarp grupių, buvo atlikti poriniai post-hoc palyginimai, atsižvelgiant į Sidak kriterijų. Jei netenkinta kintamųjų normalumo prielaida – neparametrinis Kruskal-Wallis testas. Pasirinktas statistinio reikšmingumo lygmuo (p) – $\alpha = 0,05$, statistškai reikšmingi rezultatai, kai $p < 0,05$. Šansų santykis (OR) buvo apskaičiuotas pagal alelių ir haplotipų dažnį su 95 proc. pasikliautinoju intervalu (95% CI) *VDR* ir *GC* geno polimorfizmui.

3. REZULTATAI

3.1. Klinikiniai ir demografiniai duomenys

Iš viso į tyrimą įtraukti 266 tiriamieji (93 vyrai ir 173 moterys), iš kurių 100 buvo sergantys vidutinio sunkumo ar lengvos formos atopiniu dermatitu, 85 – vidutinio sunkumo ar lengva alergine astma, 81 asmuo sudarė kontrolinę tyrimo grupę. Tirtų asmenų pagrindiniai klinikiniai ir demografiniai duomenys pateikti 3.1.1 lentelėje. Tiriamųjų amžius ir lytis tarp grupių statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Kraujo eozinofilų ir bendro IgE kiekiai buvo reikšmingai didesni sergančiųjų AD ir AA grupėse, nei kontrolinėje grupėje. Sergantiesiems atopinėmis ligomis nustatytas statistiškai reikšmingai mažesnis vitamino D kiekis, nei kontrolinėje grupėje. AD grupėje nustatytas mažesnis vitamino D kiekis serume, nei AA grupėje.

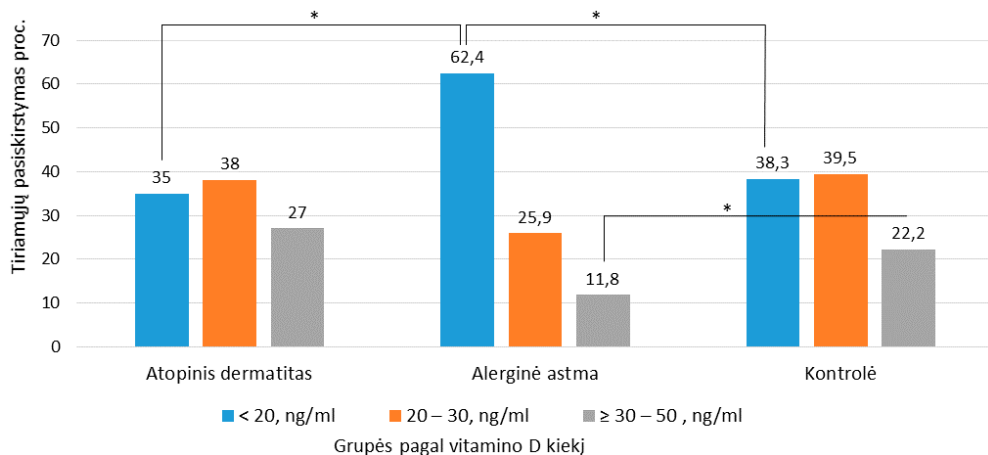
3.1.1 lentelė. Pagrindinės tiriamųjų charakteristikos

	Atopinis dermatitas (n = 100)	Alerginė astma (n = 85)	Kontrolė (n = 81)
Vyrai/moterys, n	31/69	30/55	32/49
Amžius (metai)	29,51 ± 1	40,36 ± 1,5	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
Limfocitai, proc.	28,54 ± 0,78	28,91 ± 1,01	30,86 ± 0,62
Eozinofilai, × 10 ⁹ /l	0,40 ± 0,04 **	0,33 ± 0,06 **	0,06 ± 0,01
Eozinofilai, proc.	5,65 ± 0,51 **	5,48 ± 0,49 **	1,09 ± 0,15
Neutrofilai × 10 ⁹ /l	3,85 ± 0,13	3,76 ± 0,15	3,84 ± 0,12
Neutrofilai, proc.	58,83 ± 1,01	57,97 ± 1,63	60,85 ± 0,80
Bazofilai × 10 ⁹ /l	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Bazofilai, proc.	0,45 ± 0,07	0,55 ± 0,12	0,27 ± 0,08
Monocitai × 10 ⁹ /l	0,59 ± 0,08	0,49 ± 0,02	0,45 ± 0,01
Monocitai, proc.	11,81 ± 3,12	7,52 ± 0,33	6,85 ± 0,34

Duomenys pateikiami nurodant vidurkį ± standartinę vidurkio paklaidą (SEM) ir atvejų skaičių (n), jei nenurodyta kitaip. *p < 0,05; **p < 0,001 palyginus atopinę ir kontrolinę grupes. ^fp < 0,05 palyginus atopinio dermatito ir alerginės astmos grupes.

3.2. Vitamino D kiekis, atsižvelgiant į atopijos klinikinį pobūdį

Nustačius vitamino D kiekį serume, buvo įvertintas vitamino D trūkumo (< 20 ng/ml), nepakankamumo (20–30 ng/ml) ir normalaus kiekio (≥ 30–50 ng/ml) pasiskirstymas tiriamųjų grupėse (3.2.1 pav.). Sergančiųjų AA grupėje dažniau nustatytas vitamino D trūkumas ir rečiau – normalus jo kiekis, nei kontrolinėje grupėje. AD grupėje nustatytas dažnesnis vitamino D trūkumas, nei AA grupėje, reikšmingų skirtumų tarp AD ir kontrolinės grupių nenustatyta. Vis dėlto, bendroje atopinių ligų grupėje (AD su AA) vitamino D trūkumas buvo nustatytas reikšmingai dažniau, nei kontrolinėje grupėje (46,6 proc. ir 38,3 proc., $p < 0,001$).



* $p < 0,001$ palyginus tiriamųjų grupes grupes

3.2.1 pav. Vitamino D trūkumo (< 20 ng/ml), nepakankamumo (20 – 30 ng/ml) ir normalaus kiekio (≥ 30 – 50 ng/ml) pasiskirstymas tiriamųjų grupėse

3.3. Nustatytų vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmų pasiskirstymas

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

VDR geno VNP pasiskirstymas tiriamųjų grupėse statistiškai reikšmingai nesiskyrė (3.3.1 lentelė). Vertinant *GC* geno polimorfizmų pasiskirstymą, atopijos grupėje reikšmingai dažniau nustatytas VNP rs4588 genotipas TT, nei kontrolinėje grupėje. Be to, rs4588 genotipas TT buvo reikšmingai dažniau nustatytas AD ir AA grupėse, nei kontrolinėje grupėje (13,0 ir 14,6 su 3,8 proc.; $p < 0,05$); reikšmingų skirtumų tarp AD ir AA grupių nenustatyta.

Kitų nustatytų *GC* geno polimorfizmų pasiskirstymas grupėse reikšmingai nesiskyrė.

3.3.1 lentelė. *Vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmų pasiskirstymas sergančiųjų atopinėmis ligomis (n = 185) ir kontrolinėje – sveikų tiriamųjų (n = 81) grupėse*

Genas	VNP	Grupė	Genotipo pasiskirstymas n (proc.)			MAF
<i>VDR</i>	rs731236 (TaqI) A>G		AA	AG	GG	G
		Atopija	33,1	55,2	11,6	39,2
		Kontrolė	26,0	62,3	11,7	42,8
	rs7975232 (ApaI) A>C		AA	AC	CC	C
		Atopija	26,5	48,6	24,9	49,2
		Kontrolė	25,9	46,9	27,2	49,4
	rs1544410 (BsmI) C>T		CC	CT	TT	T
		Atopija	42,2	45,9	11,9	34,9
		Kontrolė	39,2	48,1	12,7	36,7
	rs2228570 (FokI) G>A		GG	GA	AA	A
		Atopija	31,4	50,3	18,4	43,4
		Kontrolė	27,2	53,1	19,8	46,2
	rs3847987 C>A		CC	CA	AA	A
		Atopija	61,1	36,2	2,7	20,8
Kontrolė		55,6	43,2	1,2	22,6	
rs11168293 G>T		GG	GT	TT	T	
	Atopija	42,7	40,5	16,8	37,1	
	Kontrolė	42,0	43,2	14,8	36,4	
<i>GC</i>	rs4588 (Thr420Lys) G>T		GG	GT	TT	T
		Atopija	52,7	33,5	13,7*	30,5
		Kontrolė	53,2	43,0	3,8	25,3
	rs7041 (Asp432Glu) C>A		CC	CA	AA	A
		Atopija	35,0	48,3	16,7	40,9
		Kontrolė	31,3	58,8	10,0	39,4
	rs4725 (Cys299Cys) G>A		GG	GA	AA	A
		Atopija	45,0	49,7	5,3	30,2
		Kontrolė	38,2	59,2	2,6	32,2
	rs3733359 G>A		GG	GA	AA	A
Atopija		95,1	4,4	0,5	2,7	
Kontrolė		93,7	6,3	0	1,1	

VDR – vitamino D receptoriaus genas; *GC* – vitamino D surišančio baltymo genas; VNP – vieno nukleotido polimorfizmas; MAF – minorinio alelio pasiskirstymas. * $p < 0,05$ palyginus atopinę ir kontrolinę grupes.

3.4. Vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmas ir vitaminas D

VDR geno VNP pasiskirstymas atopijos ir kontrolinėje grupėse, atsižvelgiant į vitamino D kiekį, kai nustatytas vitamino D sumažėjimas (≤ 30 ng/ml) ir normalus kiekis (> 30 ng/ml), pateiktas 3.4.1 lentelėje. Įvertinus kontrolinės grupės rezultatus, nustatyta, kad reikšmingai dažnesnis rs3847987 genotipo CC ir retesnis rs3847987 genotipo AC pasiskirstymas būdingas kontrolinę grupę sudariusiems tiriamiesiems, kuriems nustatytas sumažėjęs vitamino D kiekis, nei tiems, kuriems nustatytas normalus vitamino D kiekis. Reikšmingų *VDR* geno VNP pasiskirstymo sergančiųjų atopinėmis ligomis grupėje nenustatyta.

Taikant logistinės regresijos analizės modelį, nustatyti reikšmingi ryšiai tarp genų polimorfizmų ir normalaus vitamino D kiekio, ši informacija pateikta 3.4.2 lentelėje. Svarbu tai, kad rs3847987 genotipai AA ir AC bei A alelis buvo reikšmingai susiję su normaliu vitamino D kiekiu kontrolinėje grupėje, bet ne pacientams, sergantiems atopinėmis ligomis. Kontrolinėje grupėje nustatytas reikšmingas ryšys tarp rs731236 GG genotipo ir normalaus vitamino D kiekio. Be to, kontrolinėje grupėje nustatytas reikšmingas ryšys tarp rs2228570 GG genotipo ir normalaus vitamino D kiekio bei tarp rs2228570 alelio A ir sumažėjusio vitamino D kiekio. Svarbu tai, kad sergančiųjų atopinėmis ligomis grupėje nustatytas reikšmingas ryšys tarp *VDR* VNP rs11168293 genotipo GG ir sumažėjusio vitamino D kiekio.

3.4.1 lentelė. Vitamino D receptoriaus geno polimorfizmų pasiskirstymas sergančiųjų atopinėmis ligomis ($n = 185$) ir kontrolinėje ($n = 81$) grupėse, atsižvelgiant į vitamino D kiekį serume

Genas	VNP	Vit. D kiekis, ng/ml	Genotipų pasiskirstymas n, %		
			GG	AG	AA
VDR	rs731236 (TaqI) A>G	Atopija	GG	AG	AA
		≤30	51 (34,4)	79 (54,9)	14 (9,7)
		>30	9 (24,3)	21 (56,8)	7 (18,9)
		Kontrolė			
		≤30	7 (9,5)	37 (57,1)	18 (27,0)
		>30	3 (16,7)	12 (66,7)	3 (16,7)
	rs7975232 (ApaI) A>C	Atopija	AA	AC	CC
		≤30	38 (25,7)	72 (48,6)	38 (25,7)
		>30	11 (29,7)	18 (48,6)	8 (21,6)
		Kontrolė			
		≤30	16 (25,4)	28 (44,4)	19 (30,2)
		>30	5 (27,8)	10 (55,6)	3 (16,7)
	rs1544410 (BsmI) C>T	Atopija	CC	CT	TT
		≤30	63 (42,6)	70 (47,3)	15 (10,1)
		>30	15 (40,5)	15 (40,5)	7 (18,9)
		Kontrolė			
		≤30	24 (38,1)	31 (49,2)	6 (9,5)
		>30	7 (38,9)	7 (38,9)	4 (22,2)
	rs2228570 (FokI) G>A	Atopija	GG	AG	AA
		≤30	44 (29,7)	76 (51,4)	28 (18,9)
		>30	14 (37,8)	17 (45,9)	6 (12,2)
		Kontrolė			
		≤30	19 (30,2)	35 (55,6)	9 (14,3)
		>30	3 (16,7)	8 (44,4)	7 (38,9)
rs3847987 C>A	Atopija	CC	AC	AA	
	≤30	91 (61,5)	53 (35,8)	4 (2,7)	
	>30	22 (59,5)	14 (37,8)	1 (2,7)	
	Kontrolė				
	≤30	40 (63,5)*	22 (34,9)*	1 (1,6)	
	>30	5 (27,8)	13 (72,2)	0 (0)	
rs11168293 G>T	Atopija	GG	GT	TT	
	≤30	58 (39,2)	65 (43,9)	20 (16,2)	
	>30	21 (56,8)	10 (27,0)	6 (23,5)	
	Kontrolė				
	≤30	27 (42,9)	25 (39,7)	11 (17,5)	
	>30	7 (38,9)	10 (55,6)	1 (5,6)	

VDR – vitamino D receptoriaus genas; VNP – vieno nukleotido polimorfizmas. * $p < 0,05$ palyginus su grupe, kuriai nustatytas normalus vitamino D kiekis (> 30).

3.4.2 lentelė. Vitamino D receptoriaus geno polimorfizmų sąsajos su vitamino D trūkumu (<30 ng/ml), sergančiųjų atopinėmis ligomis ir sveikų tiriamųjų grupėse

	VDR VNP	Genotipai ir aleliai	Grupė	OR	95 % CI	p reikšmė
Vitamino D kiekis <30 ng/ml su vitamino D kiekiis >30 ng/ml	rs731236 (TaqI) A>G	GG su AA	Atopija	1,683	0,947–2,993	NS
			Kontrolė	4,037	1,117–14,588	0,033*
		AG su AA	Atopija	1,889	0,470–7,587	NS
			Kontrolė	2,182	0,957–4,976	NS
		G alelio nešiotojai su neturinčiais G alelio	Atopija	1,706	0,748–3,893	NS
			Kontrolė	2,024	0,519–7,898	NS
	rs7975232 (ApaI) A>C	A alelio nešiotojai su neturinčiais A alelio	Atopija	0,462	0,171–1,243	NS
			Kontrolė	1,350	0,318–5,726	NS
		CC su AA	Atopija	0,853	0,513–1,417	NS
			Kontrolė	0,784	0,415–1,480	NS
		AC su AA	Atopija	1,143	0,332–3,937	NS
			Kontrolė	2,399	0,820 –7,019	NS
rs1544410 (BsmI) C>T	A alelio nešiotojai su neturinčiais A alelio	Atopija	1,252	0,527–2,975	NS	
		Kontrolė	2,159	0,559–8,340	NS	
		C alelio nešiotojai su C alelio neturinčiais	Atopija	0,817	0,369–1,809	NS
			Kontrolė	0,885	0,273–2,872	NS
		TT su CC	Atopija	1,400	0,824–2,378	NS
			Kontrolė	1,907	0,923–3,944	NS
	CT su CC	Atopija	0,774	0,239–2,508	NS	
		Kontrolė	2,209	0,866–5,635	NS	
		C alelio nešiotojai su neturinčiais C alelio	Atopija	0,483	0,181–1,289	NS
			Kontrolė	0,382	0,095–1,540	NS
		T alelio nešiotojai su neturinčiais T alelio	Atopija	1,087	0,522–2,262	NS
			Kontrolė	1,062	0,362–3,111	NS

3.4.2 lentelės tęsinys

VDR VNP	Genotipai ir aleliai	Grupė	OR	95 % CI	p reikšmė
rs2228570 (FokI) G>A	AA su GG	Atopija	0,821	0,481–1,399	NS
		Kontrolė	2,092	1,044–4,194	0,037*
	AG su GG	Atopija	1,448	0,343–6,108	NS
		Kontrolė	7,137	2,025–25,145	0,002*
	G alelio nešiotojai su neturinčiais G alelio	Atopija	0,695	0,328–1,475	NS
		Kontrolė	2,159	0,559–8,340	NS
	A alelio nešiotojai su neturinčiais A alelio	Atopija	1,206	0,459–3,168	NS
		Kontrolė	0,229	0,069–0,761	0,016*
	AA su CC	Atopija	1,017	0,332–3,117	NS
		Kontrolė	35,997	6,401–202,446	<0,001*
rs3847987 C>A	AC su CC	Atopija	1,093	0,516–2,315	NS
		Kontrolė	4,727	1,489–15,007	0,008*
	C alelio nešiotojai su neturinčiais C alelio	Atopija	1,000	0,108–9,221	NS
		Kontrolė	1,253	0,286–2,264	NS
	A alelio nešiotojai su neturinčiais A alelio	Atopija	1,089	0,522–2,270	NS
		Kontrolė	4,522	1,429–14,308	0,010*
	TT su GG	Atopija	1,509	0,543–4,189	NS
		Kontrolė	1,138	0,578–2,243	NS
	GT su GG	Atopija	0,425	0,185–0,977	0,044*
		Kontrolė	1,969	0,696–5,525	NS
G alelio nešiotojai su neturinčiais G alelio	Atopija	1,050	0,396–2,782	NS	
	Kontrolė	3,596	0,432–29,933	NS	
T alelio nešiotojai su neturinčiais T alelio	Atopija	0,491	0,237–1,018	NS	
	Kontrolė	1,179	0,404–3,439	NS	

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas; OR – šansų santykis; 95 % CI – pasikliautainasis intervalas. NS – nereikšminga statistiškai; p < 0,05.

Įvertinus GC geno VNP pasiskirstymą tirtose grupėse, atsižvelgiant į vitamino D kiekį dažnesnis rs4588 genotipo GG ir retesnis genotipo GT pasiskirstymas aptiktas atopijos grupėje, kai nustatytas normalus vitamino D kiekis, nei tada, kai nustatytas sumažėjęs vitamino D kiekis (3.4.3 lentelė). Reikšmingų kitų polimorfizmų pasiskirstymo grupėse nenustatyta.

Taikant logistinės regresijos analizės modelį buvo įvertintos nustatytų GC geno polimorfizmų ir vitamino D trūkumo sąsajos atopijos ir kontrolinėje grupėse (3.4.4 lentelė). Nustatytas reikšmingas ryšys tarp VNP rs4588 alelio T ir sumažėjusio vitamino D kiekio atopijos metu.

3.4.3 lentelė. *Vitaminą D surišančio baltymo geno polimorfizmų pasiskirstymas sergančiųjų atopinėmis ligomis (n = 185) ir kontrolinėje – sveikų tiriamųjų (n = 81) grupėse, atsižvelgiant į vitamino D kiekį serume*

Genas	VNP	Vit. D, ng/ml	Genotipų pasiskirstymas n, proc.		
			Atopija	GG	GT
GC	rs4588 (Thr420Lys) G>T	Atopija	GG	GT	TT
		≤30	71 (49,0)*	54 (37,2)*	20 (13,8)
		>30	25 (67,6)	7 (18,9)	5 (13,5)
		Kontrolė			
		≤30	13 (72,2)	5 (27,8)	0 (0)
		>30	29 (47,5)	29 (47,5)	3 (4,9)
	rs7041(Asp432Glu) C>A	Atopija	CC	CA	AA
		≤30	25 (17,5)	70 (49,0)	48 (33,6)
		>30	5 (13,5)	12 (45,9)	15 (40,5)
		Kontrolė			
		≤30	8 (12,9)	35 (56,5)	19 (30,6)
		>30	0 (0)	12 (66,7)	6 (33,3)
	rs4725 (Cys299Cys) G>A	Atopija	GG	AG	AA
		≤30	60 (44,8)	68 (50,7)	6 (4,5)
		>30	17 (45,9)	17 (45,9)	3 (8,1)
		Kontrolė			
		≤30	22 (37,9)	34 (58,6)	2 (3,4)
		>30	7 (38,9)	11 (61,1)	0 (0)
	rs3733359 G>A	Atopija	GG	GA	AA
		≤30	138 (95,2)	6 (4,1)	1 (0,7)
>30		35 (94,6)	2 (5,4)	0 (0)	
Kontrolė					
≤30		57 (93,4)	4 (6,6)	0 (0)	
>30		17 (94,4)	1 (5,6)	0 (0)	

GC – vitaminą D surišančio baltymo genas; VNP – vieno nukleotido polimorfizmas.

*p < 0,05 palyginus su grupe, kai nustatytas normalus vitamino D kiekis (> 30).

3.4.4 lentelė. Vitaminą D surišančio baltymo geno polimorfizmų sąsajos su vitamino D trūkumu (<30 ng/ml), tiriamųjų grupėse

	GC VNP	Genotipai ir aleliai	Grupė	OR	95% CI	p reikšmė
Vitamino D kiekis <30 ng/ml su vitamino D kiekis >30 ng/ml	rs4588 (Thr420Lys) G>T	GG su TT	Atopija	0,843	0,491–1,447	NS
			Kontrolė	0,711	0,323–1,565	NS
		GT su TT	Atopija	1,929	0,549–6,779	NS
			Kontrolė	1,156	0,509–4,467	NS
		G alelio nešiotojai su neturinčiais G alelio	Atopija	1,024	0,357–2,938	NS
			Kontrolė	1,093	0,740–5,877	NS
	T alelio nešiotojai su neturinčiais T alelio	Atopija	0,461	0215–0,986	0,046*	
		Kontrolė	0,349	0,111–1,098	NS	
	rs7041 (Asp432Glu) C>A	CC su AA	Atopija	1,438	0,846–2,444	NS
			Kontrolė	1,388	0,645–3,012	NS
		CA su AA	Atopija	1,214	0,406–3,636	NS
			Kontrolė	1,729	0,615–2,153	NS
		A alelio nešiotojai su neturinčiais A alelio	Atopija	0,741	0,353–1,557	NS
			Kontrolė	0,884	0,289–2,705	NS
	C alelio nešiotojai su neturinčiais C alelio	Atopija	1,664	0,539–5,133	NS	
		Kontrolė	1,283	0,640–3,447	NS	
	rs4725 (Cys299Cys) G>A	AA su GG	Atopija	1,328	0,632–2,794	NS
			Kontrolė	1,121	0,365–3,025	NS
		AG su GG	Atopija	0,882	0,414–1,880	NS
			Kontrolė	1,017	0,342–3,021	NS
G alelio nešiotojai su neturinčiais G alelio		Atopija	0,531	0,126–2,230	NS	
		Kontrolė	0,310	0,270–3,733	NS	
A alelio nešiotojai su neturinčiais A alelio	Atopija	0,954	0,459–1,981	NS		
	Kontrolė	1,048	0,356–3,038	NS		
rs3733359 G>A	AA su GG	Atopija	1,512	0,774–3,223	NS	
		Kontrolė	0,286	0,423–1,656	NS	
	AG su GG	Atopija	1,314	0,254–6,794	NS	
		Kontrolė	0,838	0,088–8,011	NS	
	G alelio nešiotojai su neturinčiais G alelio	Atopija	0,255	0,362–3,371	NS	
		Kontrolė	0,286	0,432–3,748	NS	
A alelio nešiotojai su neturinčiais A alelio	Atopija	1,127	0,224–5,662	NS		
	Kontrolė	0,838	0,088–8,011	NS		

GC – vitaminą D surišančio baltymo genas; VNP – vieno nukleotido polimorfizmas; OR – šansų santykis; 95% CI – pasikliautinis intervalas; NS – nereikšminga statistiškai.
*p < 0,05.

3.5. Imuninio atsako pobūdis

3.5.1. T limfocitų profilis ir jiems būdingų citokinų kiekis

T limfocitų potipių, dalyvaujančių uždegimo aktyvinyje (Th2, Th17) ir uždegimo slopinime (Th1, Treg), kiekiai bei jų santykis tiriamųjų grupėse pateikti 3.5.1.1 lentelėje. AD ir AA grupėse buvo nustatytas reikšmingai didesnis Th1, Th2, Th17 ir mažesnis Treg limfocitų kiekis, nei kontrolinėje grupėje. Taip pat atopinių ligų grupėse nustatytas mažesnis Th17/Treg limfocitų santykis, nei kontrolinėje grupėje. Vertinant Th1/Th2 santykio rodiklius, reikšmingo skirtumo tarp grupių nerasta, tačiau šių limfocitų populiacijų santykis buvo tendencingai mažesnis AD ir AA grupėse, nei kontrolinėje grupėje.

3.5.1.1 lentelė. T limfocitų potipių, dalyvaujančių uždegimo aktyvinyje (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/Th2 santykis	4,62 ± 0,68	4,88 ± 0,56	6,58 ± 0,66
Th17/Treg santykis	1,63 ± 0,33*	1,20 ± 0,13*	2,19 ± 0,31

PBMC – periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės. *p < 0,05 palyginus atopinę ir kontrolinę grupes; **p < 0,001 palyginus atopinę ir kontrolinę grupes.

Uždegimą skatinančių (IL-5, IL-17A, IL-33) ir uždegimą slopinančių (TGF-β1, IL-10, IFN-γ, IL-35) citokinų kiekiai tiriamųjų grupėse pateikti 3.5.1.2 lentelėje. AD ir AA grupėse nustatyti reikšmingai didesni uždegimą skatinančių citokinų IL-5 ir IL-17A ir uždegimą slopinančio citokino TGF-β1 kiekiai, nei kontrolinėje grupėje. Be to, AD ir AA grupėse nustatytas mažesnis IL-10 ir kiekis, nei kontrolinėje grupėje.

3.5.1.2 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 ± 12,2**	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

3.5.1.2 lentelės tęsinys

Citokinai	Atopinis dermatitas n = 36	Alerginė astma n = 29	Kontrolė n = 21
IFN- γ , pg/ml	0,74 \pm 0,19	0,81 \pm 0,29	0,71 \pm 0,22
IL-35, pg/ml	13,26 \pm 1,56	15,18 \pm 3,51	11,12 \pm 0,44
IL-33, pg/ml	103,15 \pm 31,21	81,76 \pm 16,20	36,21 \pm 10,64

*p < 0,05 palyginus atopinę ir kontrolinę grupes; **p < 0,001 palyginus atopinę ir kontrolinę grupes.

3.5.2. Sąsajos tarp imuninių žymenų

Ryšys tarp vitamino D, bendro IgE, kraujo eozinofilų ir T limfocitų potipių bei jiems būdingų citokinų kiekio atopijos metu pateiktas 3.5.2.1 lentelėje. Gauti rezultatai atskleidė silpnai teigiamą ryšį tarp bendro IgE kiekio ir Treg limfocitų, IL-5 bei TGF- β 1 kiekio atopijos metu. IgE kiekio padidėjimas taip pat buvo susijęs su eozinofilų padidėjimu kraujyje. Nustatyta silpna neigiama koreliacija tarp eozinofilų skaičiaus periferiniame kraujyje ir Th1 limfocitų bei vitamino D kiekio. Teigiamas ryšys nustatytas tarp eozinofilų ir IL-5 kiekio serume. Vitamino D kiekis tiriamųjų serume buvo neigiamai susijęs su Th1, Th2, Th17 limfocitų kiekiu bei IL-5 kiekiu serume. Teigiamas ryšys nustatytas tarp vitamino D ir IL-33 kiekio atopijos metu.

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

	IgE, U/ml	Eozinofilai, $\times 10^9/l$	Vit. D, ng/ml
IgE, U/ml	-	0,31**	0,08
Eozinofilai, $\times 10^9/l$	0,31**	-	-0,18*
Vit. 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
Th1/Th2 santykis	-0,01	-0,11	-0,14
T17/Treg santykis	-0,14	-0,20	-0,01
IL-5, pg/ml	0,29*	0,30*	-0,32*
IL-17A, pg/ml	0,02	-0,01	0,14
TGF- β 1, ng/ml	0,25*	0,05	-0,08
IL-10, pg/ml	-0,07	-0,11	0,04
IFN- γ , pg/ml	-0,02	-0,07	0,01
IL-35, pg/ml	-0,09	-0,02	0,05
IL-33, pg/ml	0,06	-0,05	0,31*

PBMC – periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės. *p < 0,05 palyginus atopinę ir kontrolinę grupes; **p < 0,001 palyginus atopinę ir kontrolinę grupes.

Reikšmingos sąsajos tarp Th1, Th2, Th17, Treg limfocitų ir jiems būdingų citokinų kiekio atopijos metu pateiktos 3.5.2.2 lentelėje. Nustatytas teigiamas ryšys tarp atopijos metu didėjančio Th2 limfocitų kiekio ir Th17, Th1 limfocitų ir TGF-β1 kiekio serume bei neigiamas ryšys su Th1/Th2, Th17/Treg limfocitų santykiu. Didėjantis Th1 limfocitų kiekis buvo susijęs su didėjančiu Th2, Th17 kiekiu ir Th17/Treg limfocitų santykiu. Th17 limfocitai, be sąsajų su Th2 ir Th1 limfocitais, taip pat buvo neigiamai susiję su IL-10 kiekiu. Nors nenustatyta reikšmingo ryšio tarp Th17 ir Treg limfocitų, tačiau Treg buvo susijęs su Th1/Th2, Treg/Th17 limfocitų santykiu ir TGF-β1 kiekiu sergančiųjų atopija serume. Įvertinus gautus rezultatus, nustatytos reikšmingos sąsajos tarp IL17A ir citokinų, kurie yra susiję su Treg limfocitų funkciniu aktyvumu. IL-17A kiekis buvo teigiamai susijęs su TGF-β1 ir IL-35, neigiamai – su IL-10. Taip pat, nustatytas neigiamas ryšys tarp IL-10 ir TGF-β1 kiekių atopijos metu. Gauti rezultatai atskleidė teigiamą ryšį tarp IL-10 ir uždegimą aktyvinančio citokino IL-33. Be to, IL-33 buvo silpnai teigiamai susijęs su Th1/Th2 limfocitų santykiu bei IL-17A, tačiau neigiamai susijęs su IFN-γ.

3.5.2.2 lentelė. Ryšys tarp T limfocitų potipių ir jiems būdingų citokinų kiekio atopijos metu

	Th1, proc. nuo PBMC	Th2, proc. nuo PBMC	Th17, proc. nuo PBMC	Treg, proc. nuo PBMC	Th1/Th2 santykis	Th17/Treg santykis	IL-17A, pg/ml	TGF-β1, ng/ml	IL-10, pg/ml	IFN-γ, pg/ml	IL-35, pg/ml	IL-33, pg/ml
Th1, proc. nuo PBMC	–	0,87**	0,84**	0,04	-0,20	0,54**	0,08	0,16	-0,19	0,05	-0,09	-0,14
Th2, proc. nuo PBMC	0,87**	–	0,78**	-0,12	-0,42**	-0,45**	0,24	0,3**	-0,15	0,11	-0,01	-0,03
Th17, proc. nuo PBMC	0,84**	0,78**	–	-0,03	0,28*	-0,81**	0,08	0,17	-0,28*	0,07	-0,09	-0,14
Treg, proc. nuo PBMC	0,04	-0,12	-0,03	–	0,28*	0,51**	-0,22	0,26**	-0,13	0,07	-0,21	-0,15
Th1/Th2 santykis	-0,20	-0,42**	0,28*	0,28*	–	-0,14	0,20	-0,18	-0,19	-0,08	-0,15	-0,29*
Th17/Treg santykis	0,54**	-0,45**	-0,81**	0,51**	-0,14	–	-0,5	-0,18	0,12	0,11	-0,05	0,09
IL-17A, pg/ml	0,08	0,24	0,08	-0,22	-0,20	-0,5	–	0,48**	-0,53*	-0,7	0,4**	0,27*
TGF-β1, ng/ml	0,16	0,3**	0,17	0,26**	-0,18	-0,18	0,48**	–	-0,6**	-0,12	-0,05	-0,04
IL-10, pg/ml	-0,19	-0,15	-0,28*	-0,13	-0,19	0,12	-0,53*	-0,6**	–	-0,15	0,17	0,36**
IFN-γ, pg/ml	0,05	0,11	0,07	0,07	-0,08	0,11	-0,07	-0,17	-0,15	–	0,12	-0,37**
IL-35, pg/ml	-0,09	-0,01	-0,09	-0,21	-0,15	0,05	0,4**	-0,05	0,17	0,12	–	-0,06
IL-33, pg/ml	-0,14	-0,3	-0,14	-0,15	0,29*	0,9	0,27*	0,04	0,36**	-0,37**	-0,06	–

PBMC – periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės. *p < 0,05 palyginus atopinę ir kontrolinę grupes; **p < 0,001 palyginus atopinę ir kontrolinę grupes.

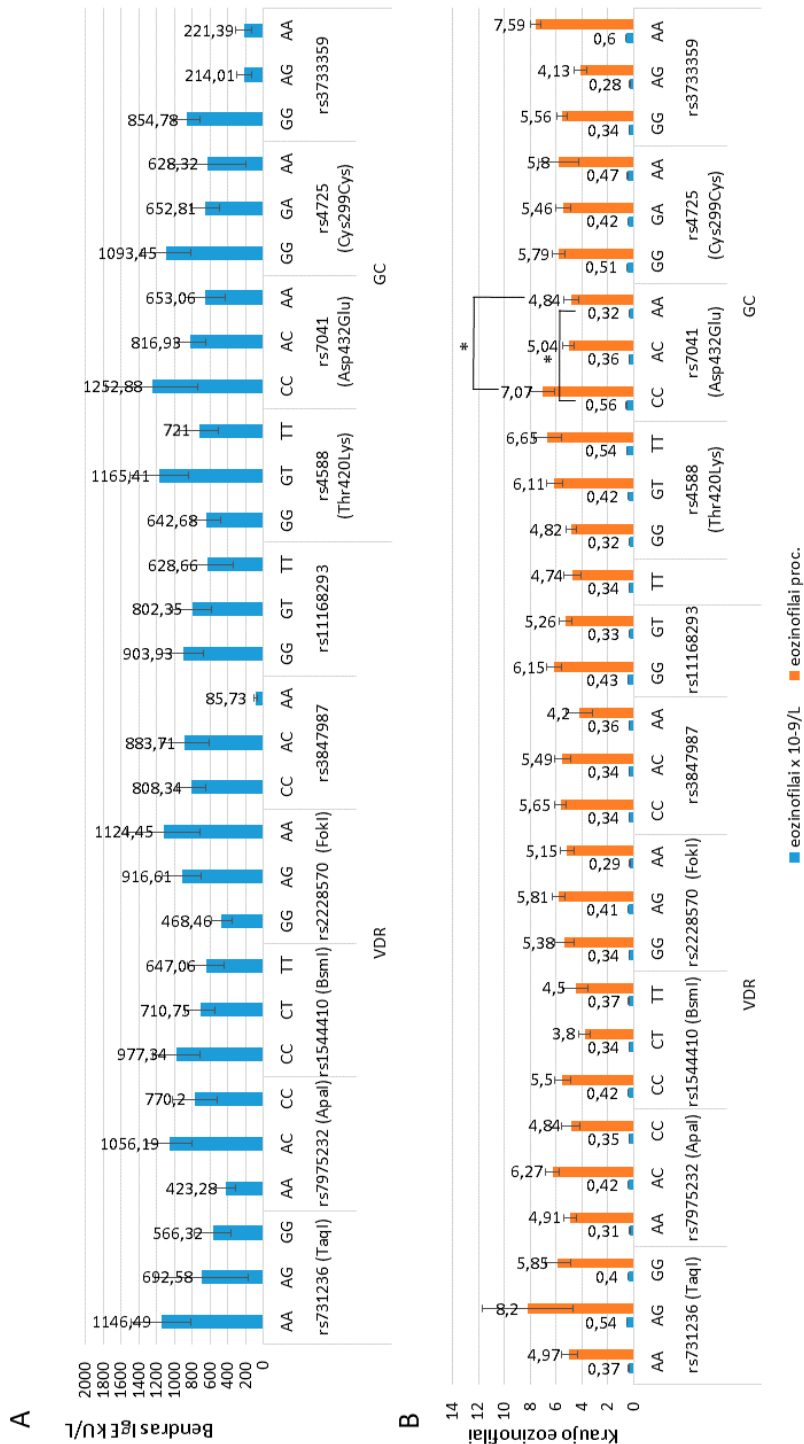
3.6. Vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmas ir imuninis atsakas

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

Gauti rezultatai atskleidė reikšmingą bendro IgE ir kraujo eozinofilų kiekių pasiskirstymą atopijos metu, atsižvelgiant į skirtingus *VDR* ir *GC* genų polimorfizmą genotipus (3.6.1.1 pav.) ir alelius (3.6.1.2 pav.)

Rezultatai parodė reikšmingą eozinofilų kiekio pasiskirstymą atopijos metu, atsižvelgiant į *GC* geno VNP rs7041. Sergantiesiems atopija, kuriems nustatytas rs7041 genotipas CC, buvo aptikti reikšmingai didesni kraujo eozinofilų kiekiai, nei tiems, kuriems nustatytas šio VNP AA genotipas (3.6.1.1 pav.). Įvertinus *GC* VNP rs7041 alelių sąsajas su atopijos žymenimis, gauti rezultatai atskleidė, kad tiriamiesiems, kurie buvo rs741 alelio C nešiotojai, buvo nustatytas didesnis kraujo eozinofilų ir bendro IgE kiekis, nei tiems, kurie alelio C neturėjo (3.6.1.2 pav.). Taip pat sergantiesiems atopija, kuriems nustatytas rs4588 T alelis, buvo įvertintas didesnis kraujo eozinofilų kiekis, nei tiems, kurie neturėjo šio alelio. Be to, pastebėta tendencija, kad turintiems rs4588 genotipą TT buvo aptiktas didesnis eozinofilų kiekis, nei tiems, kuriems nustatyti kiti šio VNP genotipai.

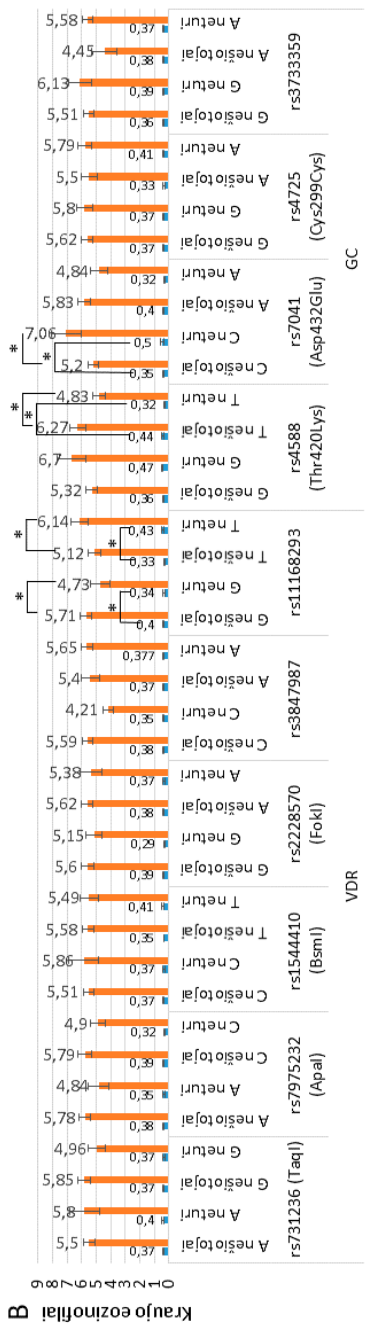
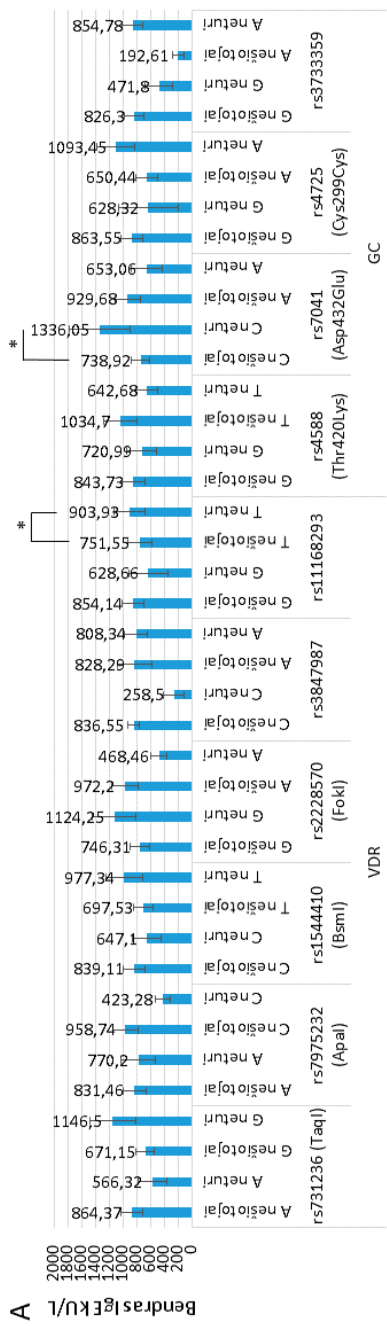
Nustatytas reikšmingas bendro IgE bei eozinofilų kiekio pasiskirstymas atopijos metu, atsižvelgiant į *VDR* polimorfizmo rs11168293 genotipus ir alelius. Sergantieji atopinėmis ligomis, kuriems nustatytas rs11168293 alelis T, pasižymėjo mažesniu bendro IgE ir kraujo eozinofilų kiekiu, nei tie, kurie neturėjo šio alelio (3.6.1.2 pav.). Be to, rs11168293 alelis G buvo reikšmingai susijęs su didesniu kraujo eozinofilų kiekiu atopijos metu. Taip pat pastebėta tendencija, kad sergantiesiems atopinėmis ligomis, kuriems aptiktas rs11168293 genotipas GG, buvo nustatytas didesnis eozinofilų kiekis, nei tiems, kurie turėjo rs11168293 genotipus GT ar TT (3.6.1.1 pav.).



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

VDR – vitamino D receptoriaus genas; GC – vitamino D surišąčio baltymo genas. Duomenys pateikiami nurodant vidurki,

*p < 0,05 palyginus VDR ar GC genų poliorfizmų genotipus.



■ eozinofilai x 10⁻⁹/L ■ eozinofilai proc.

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

VDR – vitamino D receptoriaus genas; GC – vitamino D surišančio baltymo genas. Duomenys pateikiami nurodant vidurki. *p < 0,05 palyginus VDR ar GC genų polimorfizmų alelius.

3.6.2. Genų polimorfizmas ir T limfocitų populiacijų bei jiems būdingų citokinių kiekių atopijos metu

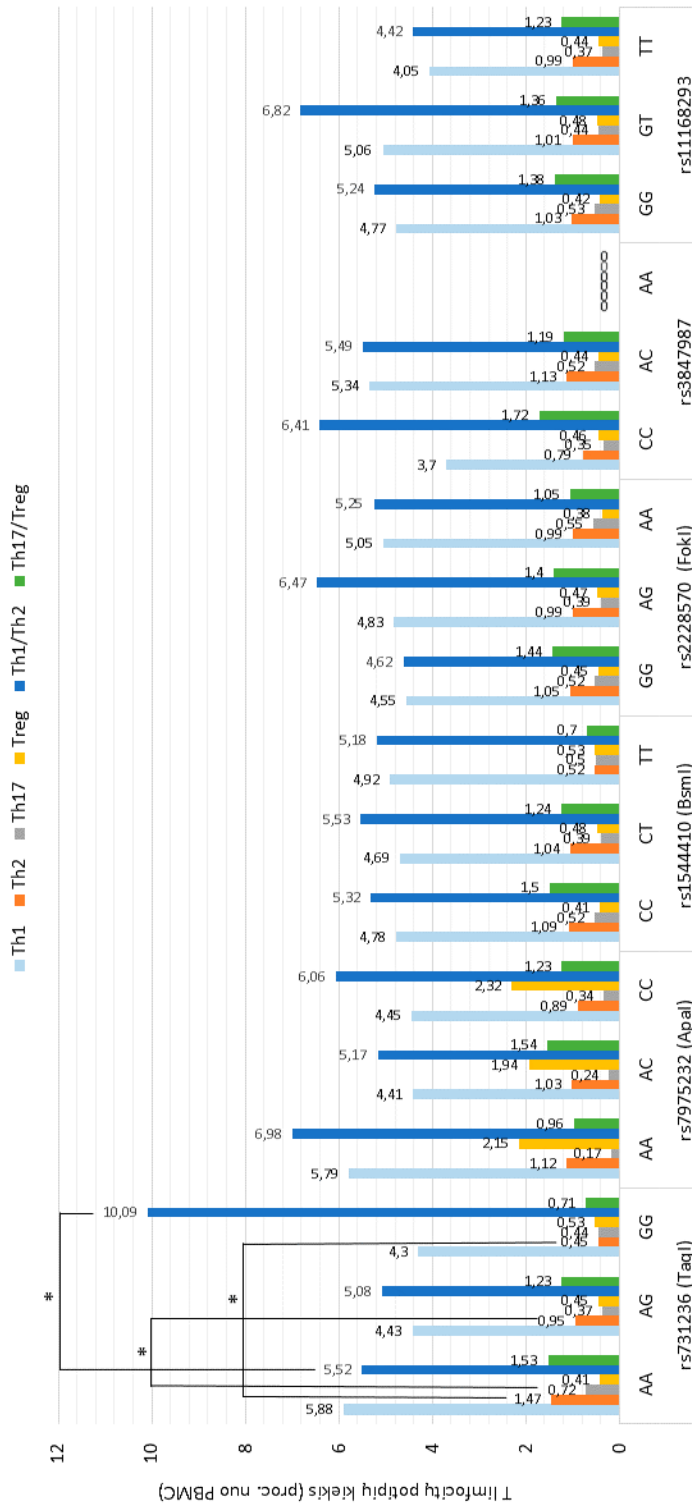
T limfocitų populiacijų ir jiems būdingų citokinių kiekio pasiskirstymas atopijos metu, atsižvelgiant į nustatytus *VDR* geno polimorfizmus, pateiktas 3.6.2.1 paveiksle. Gauti rezultatai atskleidė, kad *VDR* geno polimorfizmo rs731236 genotipo AA nešiotojams buvo nustatyti reikšmingai didesni uždegimą skatinančių T limfocitų pagalbininkų populiacijų Th2, Th17 kiekiai bei didesnis Th1/Th2 santykis nei turintiems šio polimorfizmo genotipus AG ir GG.

Atopijos metu įvertinus uždegimą skatinančių (IL-5, IL-17A, IL-33) ir uždegimą slopinančių (TGF- β 1, IL-10, IFN- γ , IL-35) citokinių kiekius, atsižvelgiant į *VDR* geno polimorfizmus (3.6.2.2 pav.), gauti rezultatai parodė, kad rs731236 genotipas GG buvo reikšmingai susijęs su mažesniais IL-10 kiekiais nei kiti šio polimorfizmo genotipai. Tiriamiesiems, kuriems nustatytas rs731236 genotipas AA, taip pat buvo nustatyti mažesni TGF- β 1 kiekiai serume, nei tiems, kurie turėjo rs731236 genotipą AG. Be to, didesni IL-10 kiekiai nustatyti tiems tiriamiesiems, kurie turėjo rs11168293 genotipą TT, lyginant su tais, kuriems nustatyti kiti rs11168293 genotipai.

T limfocitų populiacijų ir jiems būdingų citokinių kiekio pasiskirstymas atopijos metu, atsižvelgiant į nustatytus *GC* geno polimorfizmus, pateiktas 3.6.2.3 paveiksle. Gauti rezultatai parodė, kad rs4588 ir rs7041 skirtingi genotipai buvo susiję su reikšmingais T limfocitų potipių skirtumais atopijos metu. Tiriamieji sergantys atopinėmis ligomis, kuriems nustatytas *GC* geno VNP rs4588 genotipas GG, pasižymėjo reikšmingai mažesniais Th2 limfocitų kiekiais periferiniame kraujyje, nei tiriamieji, kuriems nustatytas šio polimorfizmo GT genotipas (3.6.2.3 pav.). Be to, rs4588 genotipo GG nešiotojams nustatytas reikšmingai mažesnis Th17 limfocitų kiekis, nei tiems, kuriems nustatytas rs4588 TT genotipas. Atopijos metu VNP rs7041 genotipas CC buvo reikšmingai susijęs su didesniais Th2 ir Th17 limfocitų kiekiais nei kiti šio VNP genotipai. Atopijos grupėje rs7041 genotipas CC buvo reikšmingai susijęs su padidėjusiu Th2 ir Th17 limfocitų kiekiu.

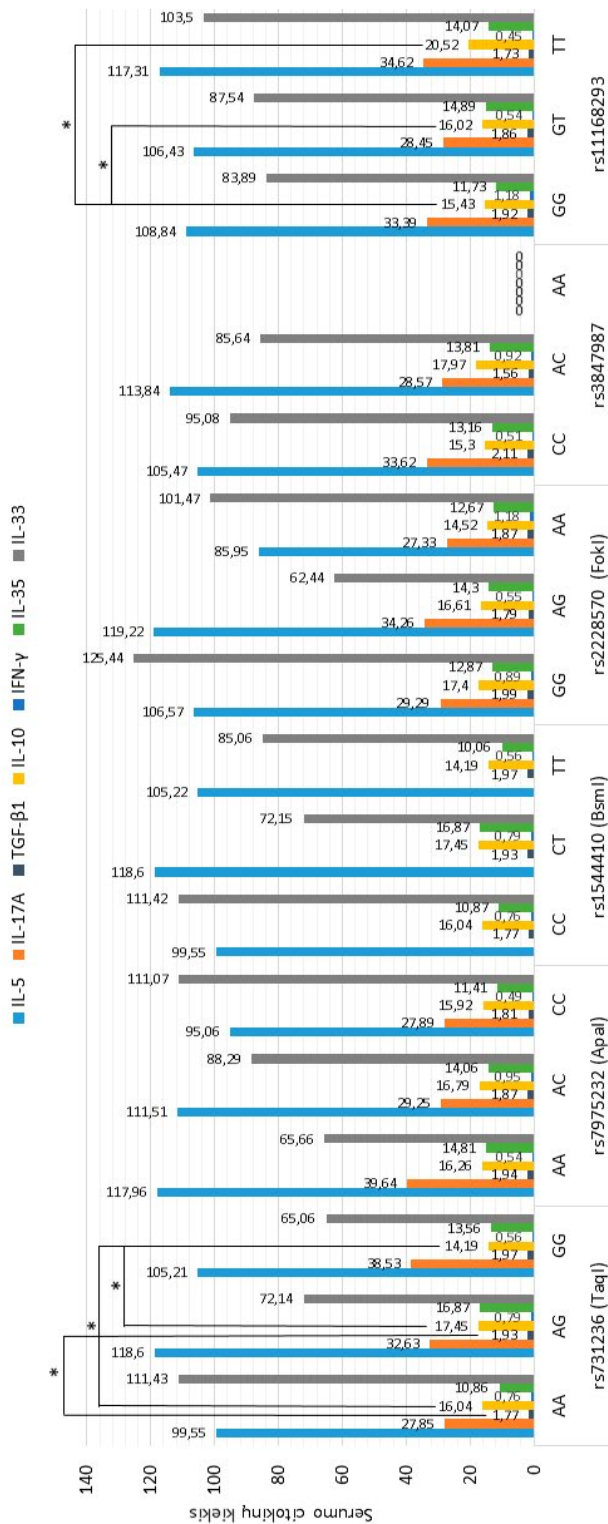
Įvertinus uždegimo reguliavime dalyvaujančių citokinių, tokių kaip IL-5, IL-17A, IL-10, TGF- β 1, IFN- γ , IL-35 ir IL-33, kiekius, atsižvelgiant į *GC* geno polimorfizmus (3.6.2.4 pav.), gauti rezultatai parodė, kad *GC* geno polimorfizmą rs4588, rs7041 ir rs3733359 skirtingi genotipai buvo reikšmingai susiję su Treg limfocitų gaminamais citokiniais TGF- β 1, IL-10 ir IL-35. Tiriamieji, sergantys atopinėmis ligomis, kuriems nustatytas rs4588 TT genotipas, pasižymėjo reikšmingai mažesniais TGF- β 1 kiekiais serume, nei tie, kuriems nustatytas GT genotipas. Sergantiems atopinėmis ligomis, kuriems nustatytas rs7041 CC, taip pat buvo nustatyti mažesni TGF- β 1 ir didesni IL-10 kiekiai,

nei tiems, kuriems aptiktas rs7041 AA genotipas. Rs7041 CC genotipas taip pat buvo susijęs su didesniais IL-35 rodikliais, nei AC genotipas. Tiriamiesiems, kuriems nustatytas rs3733359 GG, buvo nustatyti reikšmingai mažesni IL-10 kiekiai, nei turintiems šio polimorfizmo GT genotipą.



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

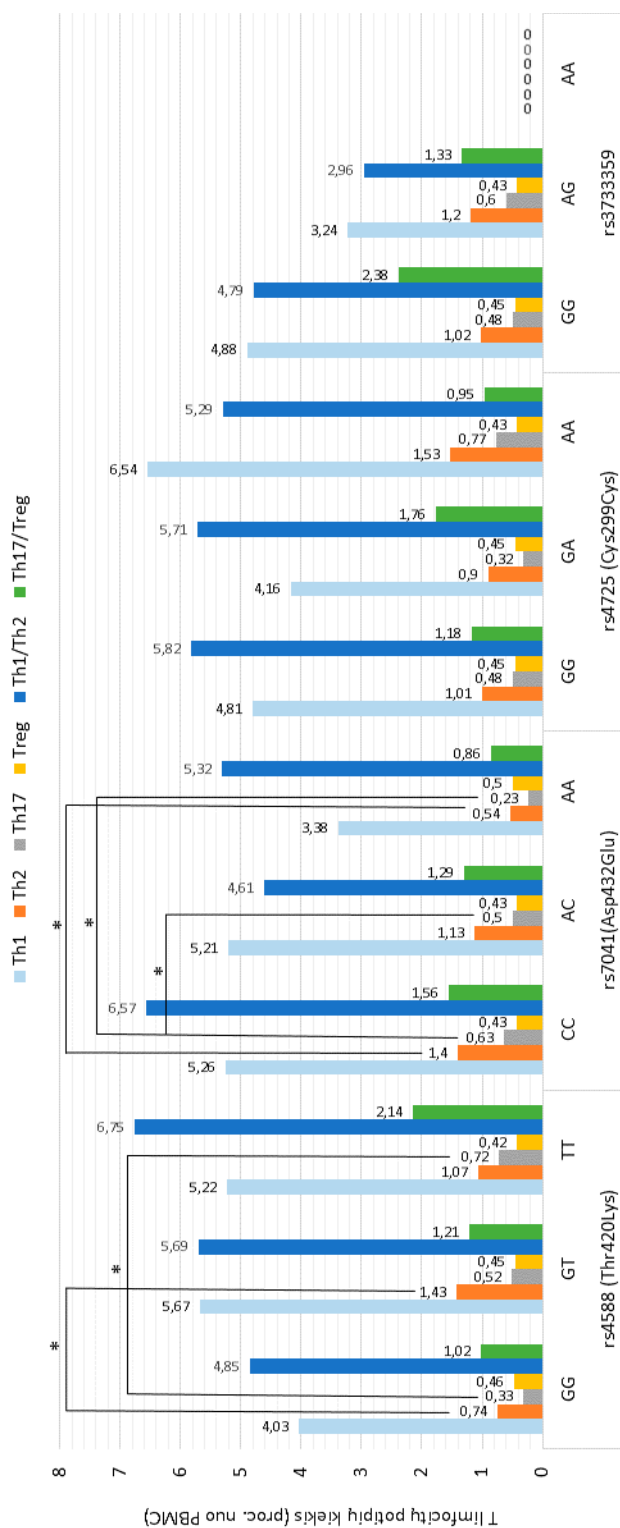
Duomenys pateikiami nurodant vidurkį, kai limfocitų populiacijų kiekis išreikštas procentais nuo periferinio kraujo mononuklearinių ląstelių skaičiaus. PBMC – periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės. *p < 0,05 palyginus vitamino D receptoriaus geno poliorfizmų genotipus.



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

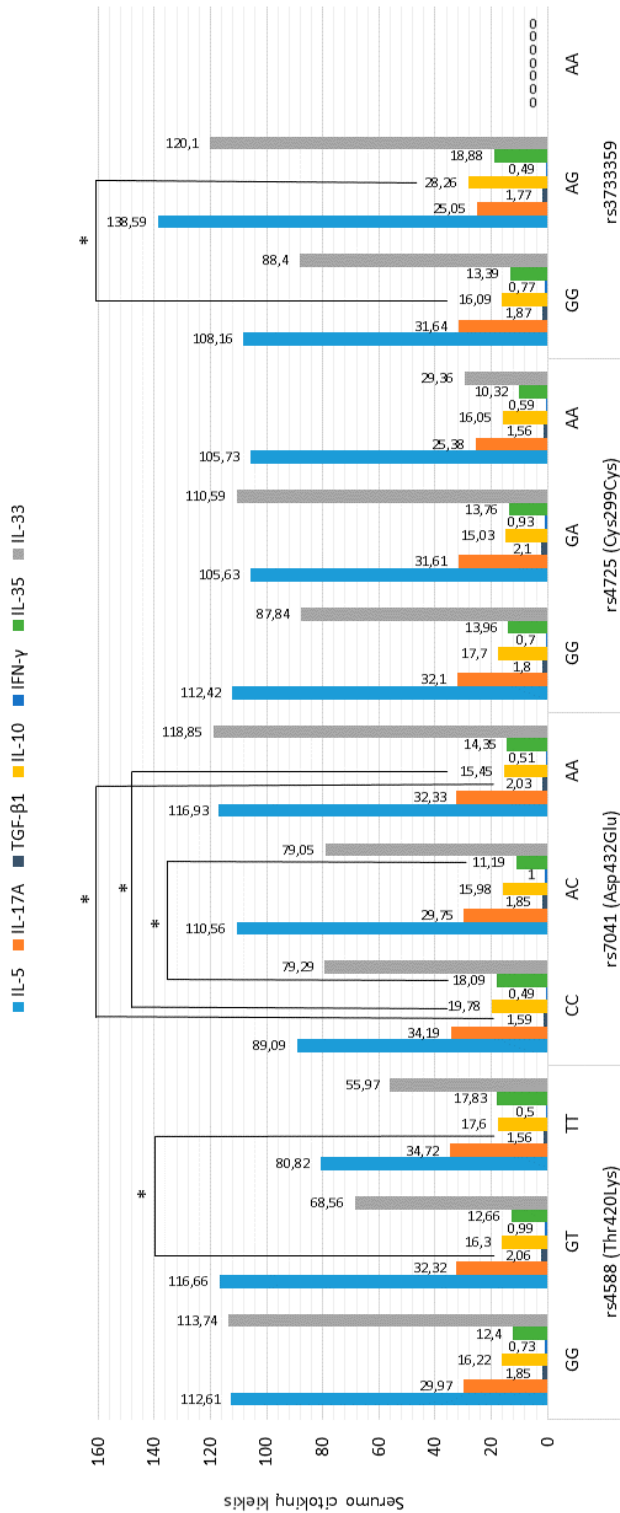
Duomenys pateikiami nurodant vidurkį, kai citokinų kiekis serume išreikštas pg/ml, TGF-β1 ng/ml.

*p < 0,05 palyginus vitamino D receptoriaus geno poliorfizmų genotipus.



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

Duomenys pateikiami nurodant vidurki, kai limfocitų populiacijų kiekis išreikštas procentais nuo periferinio kraujo mononuklearinių ląstelių skaičiaus. *p < 0,05 palyginus vitamino D surišančio baltymo geno poliorfizmų genotipus. PBMC – periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės.



3.6.2.4 pav. Uždegimą reguliuojančių citokinių 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 surišimo baltymo geno polimorfizmus

Duomenys pateikiami nurodant vidurki, kai citokinių kiekis serume išreikštas pg/ml, TGF-β1 ng/ml. *p < 0,05 palyginus vitamino D surišimo baltymo geno poliorfizmų genotipus.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Mokslininkai teigia, kad genetiniai veiksniai yra reikšmingi atopinių ligų, tokių kaip AD ir AA, vystymuisi, o gyvenimo būdas ir aplinkos veiksniai labiau susiję su ligos išraiškomis [268]. Atliktas tyrimas gali padėti detaliau suprasti atopinių ligų genetinius ir molekulinis mechanizmus. Skirtingų *VDR* ir *GC* genų polimorfizmų reikšmės imuniniam atsakui atopijos metu vertinimas gali suteikti vertingų įžvalgų apie pagrindinius biologinius kelius ir mechanizmus, susijusius su atopijos patogenezė.

Iš viso buvo ištirti šeši *VDR* geno ir keturi *GC* geno VNP ir įvertintas jų ryšys su vitamino D, bendro IgE, kraujo eozinofilų, T limfocitų potipių (Th1, Th2, Th17, Treg) ir jiems būdingų citokinų (IL-5, IFN- γ , IL-17A, IL-10, TGF- β 1, IL-35 ir IL-33) kiekiu atopijos metu (sergant atopiniu dermatitu ar alergine astma) ir kontrolinėje grupėje. Atlikta analizė parodė reikšmingą ryšį tarp kai kurių nustatytų *VDR* ir *GC* genų polimorfizmų bei vitamino D kiekio sergant atopinėmis ligomis ir tarp kai kurių nustatytų polimorfizmų ir vitamino D kiekio sveikiems tiriamiesiems. Taip pat buvo nustatyti reikšmingi imuninio atsako žymenų kiekių skirtumai, priklausantys nuo konkretaus polimorfizmo genotipo ar alelio modelio.

4.1. Vitamino D kiekis

Atlikto tyrimo rezultatai parodė, kad vitamino D kiekis buvo reikšmingai mažesnis ir jo trūkumas dažniau nustatytas sergant atopinėmis ligomis, tokiomis kaip AD ar AA, nei kontrolinėje grupėje. Be to, šie rezultatai sutampa su kitų mokslininkų duomenimis ir prisideda prie hipotezės, kad vitamino D kiekis organizme gali būti susijęs su atopinių ligų rizika ar sunkumu [269–272]. Tai leidžia daryti prielaidą apie vitamino D vaidmens svarbą imuninio atsako reguliavimui. Be to, AD grupėje vitamino D trūkumas buvo ryškesnis nei AA grupėje. Tokie rezultatai leidžia manyti, kad vitamino D koncentracija kraujyje gali būti susijusi su skirtingomis atopijos formomis. Vis dėlto išlieka neaiškūs pagrindiniai vitamino D poveikio mechanizmai ir ar vitamino D trūkumas prisideda prie atopijos raiškos. Australijos mokslininkų atlikto tyrimo metu šešerių metų amžiaus vaikams nustatytas vitamino D trūkumas buvo susijęs su sergamumu astma ir alerginiu įsijautrinimu vyresniame amžiuje, be to, nustatytas mažas vitamino D kiekis buvo reikšmingai susijęs būtent su alerginiais astmos fenotipais [187]. Be to, Zhu ir kt. atliktame didelės imties skerspjūvio tyrime, kuriame dalyvavo 435040 suaugusieji, sergantys astma, nustatyta, kad vitamino D trūkumas buvo susijęs su didėjančia tikimybe sirgti astma bei plaučių funkcijos rodiklių blogėjimu [269]. Kitame skerspjūvio tyrime pateikiami nuoseklūs duomenys, demonstruojantys ryšį tarp vitamino

D kiekio mažėjimo kas 10 ng/ml ir didėjančio astmos paplitimo [273]. Be to, Baek su bendraautorais atlikto skerspjūvio tyrimo rezultatai atskleidė, kad vitamino D trūkumas padidino įsijautrinimo maisto alergenams riziką ir atopinio dermatito sunkumą [270]. Tokie duomenys papildo atlikto tyrimo metu gautus rezultatus ir leidžia teigti prielaidą, kad vitaminas D dėl uždegimą slopinančio veikimo atlieka svarbų vaidmenį atopinių ligų patogenezėje. Be to, vertinant vitamino D vaidmenį atopijos metu, yra svarbu atsižvelgti į šio vitamino papildų vartojimą. Dalies mokslinių studijų duomenys parodė, kad vitamino D papildų vartojimas gali sumažinti atopinių ligų sunkumą [203,272,274]. Vis dėlto, apie vitamino D papildų vartojimo naudą pateikiami ir prieštaringi tyrimų rezultatai [275]. Nors šio tyrimo metu nebuvo tirta vitamino D papildų vartojimo sąsajų su atopijos pasireiškimu, tokie rezultatai demonstruoja reikšmingą vitamino D vaidmenį ir suteikia pagrindą gilintis į vitamino D veikimo mechanizmus ir detaliam išsiaiškinti jo reikšmę atopijos patogenezėje.

4.2. Vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genu polimorfizmas ir vitaminas D

Atlikto tyrimo metu buvo nustatyti šeši *VDR* geno vieno nukleotido polimorfizmai. Logistinės regresijos analizė atskleidė reikšmingas sąsajas tarp *VDR* geno polimorfizmo rs11168293 genotipo GG ir atopijos metu nustatyto sumažėjusio vitamino D kiekio (< 30 ng/ml). Tokie rezultatai leidžia teigti, kad skirtingos *VDR* geno variacijos yra svarbios reguliuojant vitamino D kiekį ir tai gali atlikti reikšmingą vaidmenį atopijos patogenezėje. Be to, nustatytas *VDR* polimorfizmo ir vitamino D koncentracijos kitimo ryšys gali būti svarbus veiksnys imuninio atsako reguliavimui ir būti susijęs su didesne atopinių ligų rizika [229]. Deja, rs11168293 variantas yra mažai ištirtas, o mokslinėje literatūroje kol kas nėra duomenų apie šio polimorfizmo vaidmenį atopinių ligų kontekste. Todėl, siekiant patvirtinti gautus rezultatus, svarbu detaliam iširti šį *VDR* geno polimorfizmą.

Tyrimo rezultatai taip pat atskleidė reikšmingą ryšį tarp rs2228570 GG genotipo ir normalaus vitamino D kiekio kontrolinėje grupėje, kurią sudarė atopinėmis ligomis nesergantys asmenys. Tai reiškia, kad šis genotipas gali būti susijęs su efektyvesniu vitamino D metabolizmu arba jo kiekio reguliavimu sveikiems asmenims. Vis dėlto, atopinėmis ligomis sergančiųjų grupėje šis ryšys nebuvo statistiškai reikšmingas, tai gali reikšti, jog šio geno poveikis atopinėms ligoms gali būti silpnas arba pakitęs dėl kitų genetinių ir aplinkos veiksnių. Įdomu tai, kad nors dabartiniame tyrime nebuvo aptikta reikšmingų rezultatų tarp rs2228570 genotipo ir atopijos, ankstesnis pilotinis tyrimas, atliktas su mažesnėmis imtimis, parodė šio genotipo ryšį su alergine astma. Be

to, vertinat *VDR* geno polimorfizmą pasiskirstymą tarp sergančiųjų atopinėmis ligomis ir sveikų tiriamųjų, rezultatai statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Vis dėlto, kai kuriuose tyrimuose atskleidžiama, kad rs2228570 bei šio VNP alelis A buvo susiję su padidėjusia atopinių ligų rizika [185,220,238,242]. Tokie rezultatai demonstruoja šio polimorfizmo ryšį su vitamino D kiekiu, tačiau parodo, kad svarbu atlikti išsamesnius tyrimus su didesnėmis imtimis, jog ši hipotezė būtų patikimiau patvirtinta. Yra tikimybė, kad tam tikri *VDR* VNP gali paveikti genus ekspresuojančių baltymų struktūrą ir turėti įtakos *VDR* funkcijai ir signalizacijos keliui vitamino D metabolizme [215,230]. Būtent polimorfizmas rs2228570, esantis *VDR* geno 2 egzono 5' gale, gali paveikti mRNR susijungimą ir *VDR* baltymo struktūrą [230]. Tyrimai rodo, kad rs2228570 polimorfizme C alelį pakeitus T aleliu, gali susidaryti šiek tiek trumpesnis *VDR* baltymas [276]. Trumpesnė *VDR* forma gali būti mažiau veiksminga reguliuojant genų ekspresiją ir reaguojant į vitaminą D [277]. Tuncel ir kt. ištyrė keturis dažniausiai pasitaikančius *VDR* polimorfizmus – rs1544410, rs731236, rs7975232 ir rs2228570 – Kipro turkų grupėje ir nustatė stiprų ryšį tarp rs2228570 T alelio ir sumažėjusio vitamino D kiekio [241]. Keletas kitų publikacijų taip pat pranešė apie ryšį tarp *VDR* VNP rs2228570 arba rs1544410 ir sumažėjusio vitamino D kiekio [8,241,278]. Mūsų tyrimo rezultatai parodė, kad rs2228570 alelis A buvo susijęs su sumažėjusiu vitamino D kiekiu kontrolinėje grupėje, tačiau atsižvelgus į kitų mokslininkų duomenis, negalima atmesti šio VNP reikšmingumo sergant atopinėmis ligomis.

Įvertinus gautus rezultatus nustatytas reikšmingas ryšys tarp *VDR* geno polimorfizmo rs731236 GG genotipo ir normalaus vitamino D kiekio kontrolinėje grupėje. Pilotinio tyrimo metu, vertinant mažesnes tiriamųjų grupes, nustatytas reikšmingas rs731236 ryšys su vitamino D kiekiu ir atopijos grupėje, todėl rezultatus reikėtų vertinti kritiškai ir neatmesti tikimybės, kad šis polimorfizmas gali būti reikšmingas sergant atopinėmis ligomis. Be to, Ispanijos mokslininkai atskleidė, kad rs2238136 yra potencialus AD rizikos veiksnys [279], dar labiau pabrėžiant *VDR* geno variacijų svarbą atopinėms ligoms. Airijos mokslininkai nustatė reikšmingą ryšį tarp rs731236 C alelio ir nekontroliuojamos astmos rizikos [280], parodydami, kad šis polimorfizmas gali būti svarbus ne tik vitamino D metabolizmui, bet ir atopinių ligų progresavimui. Vis dėlto, pateikiama ir prieštaringų duomenų, kai nenustatyta šio polimorfizmo sąsajų su vitamin D kiekiu [281]. Atlikto tyrimo ir kitų mokslininkų pateikti duomenys galėjo nesutapti dėl genetinės įvairovės, kuri apima skirtingus alelius, pasireiškiančius įvairiose populiacijose.

Atlikto tyrimo metu taip pat nustatytas reikšmingas ryšys tarp rs3847987 genotipų AA, AC, alelio A ir normalaus vitamino D kiekio bei tarp rs3847987 genotipo CC ir sumažėjusio vitamino D kiekio kontrolinėje grupėje. Tokie duomenys sutampa su Kinijos mokslininkų atvejo ir kontrolės tyrimo rezulta-

tais, kai nustatytos reikšmingos sąsajos tarp rs3847987 ir vitamino D kiekio [230,282]. Vis dėlto, šiuo metu nėra rasta duomenų, rodančių, kad šis polimorfizmas galėtų būti susijęs su atopijos pasireiškimu. Tai rodo, kad nors tam tikri *VDR* geno variantai gali turėti įtakos vitamino D kiekiui, jų poveikis atopinių ligų vystymuisi išlieka neaiškus ir reikalauja išsamesnių tyrimų.

Atlikto tyrimo metu buvo nustatyti keturi vitamino D surišančio baltymo *GC* geno polimorfizmai. Gauti rezultatai atskleidė reikšmingą ryšį tarp *GC* VNP rs4588 alelio T ir sumažėjusio vitamino D kiekio atopijos metu. Be to, reikšmingai dažnesnis rs4588 genotipų GG ir retesnis GT pasiskirstymas atopijos grupėje aptiktas tiriamiesiems, kuriems nustatytas normalus vitamino D kiekis, nei tiems, kurie turėjo sumažėjusį šio vitamino kiekį. Žinoma, kad *GC* genas koduoja vitamino D surišantį baltymą, kuris atlieka pagrindinį vaidmenį transportuojant vitamino D ir jo metabolitus į įvairius audinius [246]. Įvairūs *GC* geno polimorfizmai gali būti susiję su *GC* baltymo stabilumu ir funkcinėms savybėms [246]. Taigi, tokie *GC* geno VNP kaip rs4588 galėtų paaiškinti vitamino D kiekio pokyčius. Mūsų rezultatai sutampa su naujausiu atvejo-kontrolės tyrimų duomenimis, kurie atskleidžia reikšmingą *GC* geno polimorfizmo ryšį su vitamino D kiekiu atopijos metu [10,256,283]. Indijos mokslininkai nustatė, kad rs4588 CC genotipas buvo susijęs su padidėjusiu vitamino D kiekiu, o AA genotipas – su sumažėjusiu vitamino D kiekiu AD metu [10]. Saudo Arabijos mokslininkų atliktame tyrime, kuriame buvo vertintas vitamino D papildų veiksmingumas, atsižvelgiant į *GC* geno VNP rs7041 ir rs4588, pranešta, kad tam tikri šių VNP genotipiniai variantai buvo susiję su vitamino D papildų vartojimo neveiksmingumu [284]. Tyrimo rezultatai parodė, kad tiriamiesiems, turintiems *GC* geno VNP rs7041 GG ir rs4588 CC genotipus, buvo nustatytas reikšmingai mažesnis vitamino D kiekis, nei turint kitus šių *GC* geno VNP genotipus, o vitamino D kiekio padidėjimas po papildų vartojimo buvo susijęs su rs7041 genotipu GG ir rs4588 genotipu CC, bet ne su kitais genotipais [284]. Be to, rs4588 alelio A ir rs7041 alelio T nešiotojams buvo nustatytas sumažėjęs vitamino D kiekis, kuris mažiausiai padidėjo po vitamino D papildų vartojimo, nei tiems, kuriems nustatyti kiti šių polimorfizmų aleliai [284]. Šie duomenys patvirtina mūsų tyrimo metu nustatytą ryšį tarp rs4588 alelio T ir sumažėjusio vitamino D kiekio atopijos metu bei dažniau nustatomo rs4588 genotipo GG esant normaliam vitamino D kiekiui, nei jo sumažėjimui atopijos metu. Tokie rezultatai atskleidžia, kad *GC* geno VNP rs4588 gali būti potencialus vitamino D kiekio serume moduliatorius ir atlikti svarbų vaidmenį atopinių ligų patogenezėje. Vis dėlto, neradome reikšmingo ryšio tarp vitamino D kiekio ir VNP rs7041, tokiems rezultatams galėjo turėti įtakos tai, kad tyrimo metu buvo vertinti sergantieji lengvos ir vidutinės formos atopinėmis ligomis, be to, skirtingų tyrimų rezultatai gali skirtis dėl etninių ir geografinių tiriamųjų grupių skirtumų.

4.3. Imuninis atsakas atopijos metu

Tyrimo rezultatai parodė reikšmingai didesnę Th2, Th1, Th17 ir mažesnę Treg limfocitų kiekį atopijos metu, nei kontrolinėje grupėje. Taip pat atopijos grupėje nustatytas mažesnis Th17/Treg limfocitų santykis, nei kontrolinėje grupėje. Nors reikšmingų rezultatų nebuvo nustatyta vertinant Th1/Th2 limfocitų santykį, atopijos metu stebimas tendencingai mažesnis Th1/Th2 santykis, nei kontrolinėje grupėje. Be to, atopijos metu nustatytas reikšmingai didesnis Th2 ir Th17 limfocitų gaminamų citokinų IL-5 ir IL-17A kiekis bei mažesnis Treg limfocitams būdingų IL-10 ir TGF- β 1 kiekis, lyginant su kontrolinės grupės duomenimis.

Th2 limfocitai, kurie išskiria citokinus, tokius kaip IL-4, IL-5 ir IL-13, paprastai laikomi pagrindiniais atopijos patogenezėje dalyvaujančiais limfocitais [1]. Šie citokinai yra atsakingi už IgE sintezę, eozinofilų aktyvaciją ir alerginį uždegimą [66,67]. Mūsų rezultatai sutampa su literatūros duomenimis, kuriuose nurodoma, kad atopijos pasireiškimas yra siejamas su Th2 limfocitų aktyvumu bei Th1 ir Th2 limfocitų ir jiems būdingų citokinų pusiausvyros sutrikimu [285,286].

Svarbu tai, kad atopijos grupėje buvo nustatytas padidėjęs Th17 limfocitų kiekis ir jų funkcinis aktyvumas išskiriant citokiną IL-17A bei sumažėjęs Treg limfocitų ir jų gaminamų citokinų (IL-10, TGF- β 1) kiekis. Tokie rezultatai patvirtina duomenis apie reikšmingą Treg ir Th17 limfocitų vaidmenį atopijos patogenezėje [72,73]. Paprastai Treg limfocitai slopina Th17 ir Th2 ląstelių inicijuotą imuninį uždegimą, išskirdami tokius citokinus kaip TGF- β , IL-10 ir IL-35 [287]. Be to, atopijos metu nustatytos sąsajos tarp didėjančio Treg ir TGF- β 1 kiekio, o TGF- β 1 buvo teigiamai susijęs su IL-17 kiekiu. Žinoma, kad jauni, dar nesubrendę CD4⁺ T limfocitai gali diferencijuotis į Treg ląsteles dėl TGF- β poveikio ir vaidinti svarbų vaidmenį reguliuojant Th17 limfocitų skaičių arba funkcinį aktyvumą [73]. Be to, yra įrodymų, kad sutrikusi pusiausvyra tarp Treg ir kitų CD4⁺ T limfocitų gali būti susijusi su atopinių ligų išsivystymu [288]. Gauti rezultatai sutampa su tyrimais, parodančiais, kad TGF- β atlieka reikšmingą vaidmenį, skatindamas Treg limfocitų diferenciaciją ir slopindamas Th17 limfocitų funkcinį aktyvumą atopijos metu [103,104]. Imuninio uždegimo reguliavime tai ypač svarbu, nes Th17 limfocitų kiekis ir aktyvumas gali būti reikšmingai susijęs su atopinių ligų progresavimu ir sunkumu [12,73]. Be to, didėjantis IL-17A kiekis buvo susijęs su didėjančiu TGF- β 1, bet ir su IL-35 kiekiu. Skirtingai nei TGF- β , IL-35 yra gaminamas ir išskiriamas žmogaus audiniuose reaguojant į uždegimą [289]. Gauti rezultatai sutampa su tyrimais, nurodančiais, kad IL-35 tiesiogiai slopina Th17 ląstelių diferenciaciją, sumažindamas IL-17 ir ROR γ t gamybą, kuris yra pagrindinis transkripcijos veiksnys, reguliuojantis Th17 limfocitų

vystymąsi [113,114]. Nors ir nebuvo nustatytas reikšmingas IL-35 skirtumas tarp atopinės ir kontrolinės grupių, tačiau kitų mokslininkų tyrimų duomenys atskleidžia, kad šis citokinas reikšmingai prisideda kontroliuojant alergines reakcijas [115,116].

Be to, atopijos metu didėjantis Th2 limfocitų kiekis buvo susijęs didėjančiu Th17 limfocitų kiekiu. Tai atskleidžia, kad Th2 ir Th17 limfocitų ryšys, papildant vienas kito veikimą, gali būti reikšmingas atopinių ligų patogenezėje ir būti susijęs su alerginio uždegimo sunkumu. Tokie rezultatai sutampa su Domvri ir kt. atliktu tyrimu, kuris parodė Th2 ir Th17 išskiriamų citokinų ryšį su astmos sunkumu, atopija, eozinofiliniu uždegimu ir atskleidė Th2, Th17 limfocitų svarbą sergant sunkia eozinofiline ar alergine astma [15]. Vis dėlto yra tyrimų, rodančių, kad Th17 ir Treg limfocitai gali veikti nepriklausomai nuo Th2 limfocitų. Zou ir kt. atliktame tyrime demonstruojamas reikšmingas ryšys tarp Th17/Treg santykio, plaučių funkcijos rodiklių ir astmos sunkumo, tačiau nerasta sąsajų su Th2 limfocitų kiekiu [12]. Kita vertus, Th17 ląstelės apibrėžiamos pagal citokinų IL-17A/F gamybą, todėl reikėtų atsižvelgti į visų citokinų, kuriuos gamina Th17, poveikį [83]. Mūsų rezultatai parodė, kad ne tik Th2 ir Th1 limfocitai, bet ir Th17 bei Treg limfocitai ir jų pusiausvyros sutrikimas vaidina svarbų vaidmenį atopinių ligų patogenezėje ir šių limfocitų aktyvumo nustatymas gali būti naudingas vertinant atopijos raišką ar ieškant geresnių atopinių ligų kontrolės strategijų.

Atopijos metu didėjantis IL-17A kiekis buvo susijęs su didėjančiais TGF- β 1 ir IL-35 kiekiais ir mažėjančiu IL-10 kiekiu. TGF- β 1 taip pat buvo neigiamai susijęs su IL-10 kiekiu. Manoma, kad IL-10 gali veikti kaip bendras inhibitorius, slopinant TGF- β 1 gamybą ir taip inicijuojant grįžtamąjį neigiamą ryšį Treg limfocituose bei slopinant IFN- γ gamybą Th1 limfocituose ryšį ir skatinant didesnę IFN- γ išsiskyrimą, kuris yra svarbus Th1/Th2 limfocitų reguliavimui [121]. Tačiau tikslus IL-10 veikimas atopijos metu yra prieštaringas: vienuose tyrimuose nustatytas IL-10 padidėjimas atopijos metu, kituose – sumažėjimas [122–124]. Gauti rezultatai leidžia teigti, kad IL-10 slopinamasis poveikis IFN- γ gamybai gali būti susijęs su IL-33 aktyvumu. Be to, didėjantis IL-10 kiekis buvo teigiamai susijęs su uždegimą aktyvinančio citokino IL-33 kiekiu. Tokie rezultatai sutampa su naujausių tyrimų duomenimis, atskleidžiančiais, kad IL-33 sukkelto 2 tipo uždegimo metu padidėjęs citokinas IL-10 dalyvauja inicijuojant putliųjų ląstelių veikimą ir jų degranuliaciją, aktyvindamas ST2 receptorių, kuris paskatino tolimesnę IL-33 išsiskyrimą [129]. IL-10, aktyvindamas putliąsias ląsteles atlieka reikšmingą vaidmenį, kuris gali būti susijęs tiek su nuo putliųjų ląstelių veiklos priklausomais sutrikimais [129], tiek su atopinių ligų patogenezė. Taigi, šie duomenys paaiškina svarbą IL-10, ST2 receptoriaus ir IL-33 kaskados veikimą, kuri aktyvina Th2 imuninį atsaką ir gali pabloginti atopinių ligų eigą. Be to, IL-33 buvo teigiamai

susijęs su Th1/Th2 limfocitų santykiu bei IL-17A, tačiau neigiamai su IFN- γ . Gauti rezultatai sutampa su kitų tyrėjų duomenimis, nurodančiais, kad IL-33 veikimas yra susijęs su Th2 limfocitų aktyvumu [129]. Be to, IL-33 pasyviai išsiskiria iš pažeistų ląstelių ir veikia kaip signalinis citokinas, aktyvinantis imuninį atsaką atopijos metu ir tarpininkaudamas uždegiminėse reakcijose [130,140].

Gauti rezultatai atskleidė reikšmingą ryšį tarp atopijos metu didėjančio bendro IgE ir Treg limfocitų, TGF- β 1, IL-5 kiekių bei tarp kraujo eozinofilų ir IL-5 kiekių sergančiųjų atopinėmis ligomis grupėje. Svarbu tai, kad Treg limfocitai gali slopinti efektorinių Th limfocitų, tokių kaip Th2 arba Th17, proliferaciją ir aktyvaciją atopijos metu [13]. Th2 limfocitų inicijuoto imuninio atsako metu taip pat didėja IL-5 kiekis, kuris yra reikšmingai susijęs su eozinofilų kiekiu didėjimu [66] bei alerginio uždegimo aktyvinimu [67]. Didėjant Th2 aktyvumui, taip pat padidėja ir Treg limfocitų ir jų išskiriamų citokinių kiekis, kurių tikslas slopinti imuninį uždegimą, vis dėlto atopinėms ligoms būdingas santykinis Treg trūkumas, kuris yra susijęs su Th2 ir Th17 limfocitų aktyvumu [14,73,90]. Nors nerasta reikšmingos koreliacijos tarp IgE bei eozinofilų rodiklių ir Th17 limfocitų, tačiau reikšminga IgE koreliacija su Treg limfocitų TGF- β 1 kiekiu serume atopijos metu rodo, kad Th17/Treg santykis taip pat gali būti susijęs su padidėjusiu alerginiu uždegimu. Be to, Milovanovič ir kt. atskleidė, kad Th17 limfocitai vaidina svarbų vaidmenį atopinių ligų patogenezėje, o Th17 gaminami citokinai padidina IgE gamybą B limfocituose [85]. Be to, eksperimentinis tyrimas parodė, kad *in vitro* Th17 limfocitų pašalinimas iš sergančių AA ir AD kraujo buvo susijęs su sumažėjusiu IgE kiekiu, o rekombinantinio IL-17A pridėjimas IgE kiekį padidino [85]. Tokie rezultatai atskleidžia, kad kartu su IgE kiekiu didėjantis Treg limfocitų ir jų išskiriamų citokinių, tokių kaip TGF- β 1, kiekis kontroliuoja ne tik Th2 limfocitų, bet ir Th17 limfocitų ir jų išskiriamų citokinių kiekį, taip slopinant alerginį uždegimą.

4.4. Imuninis atsakas ir vitaminas D

Manoma, kad vitaminas D atlieka svarbų vaidmenį alerginio uždegimo mechanizmų reguliavime [160]. Atlikto tyrimo metu nustatytas neigiamas ryšys tarp vitamino D ir uždegimą skatinančių Th2, Th17 limfocitų kiekio periferiniame kraujyje bei IL-5 kiekio serume atopijos metu. Tokie rezultatai sutampa su kitų tyrimų duomenimis [290,291] ir leidžia daryti prielaidą, kad vitaminas D slopina alerginio uždegimo mechanizmus reikšmingai dalyvaujdamas imuninio atsako reguliavime sergant atopinėmis ligomis. Gauti rezultatai leidžia teigti, kad vitaminas D veikia slopindamas antigenų stimuliuojamą jaunų CD4⁺ T limfocitų virsmą Th2 ir Th17 limfocitais, taip reguliuodamas

Th1 limfocitų kiekį bei slopindamas imuninį atsaką skatinančių citokinų, tokių kaip IL-5, gamybą. Be to, kitų mokslininkų atlikti tyrimai patvirtina, kad vitaminas D prisideda prie Th1 ir Th2 limfocitų pusiausvyros reguliavimo, taip pat moduliuoja imuninę pusiausvyrą tarp Th17 ir Treg limfocitų [292,293]. Atlikto tyrimo rezultatai sutampa su mokslininkų tyrimų duomenimis, kuriuose buvo vertintas Th2 limfocitų ir vitamino D ryšys pacientams, sergantiems atopinėmis ligomis [294,295], ir leidžia manyti, kad vitaminas D gali reikšmingai prisidėti prie alerginio uždegimo slopinimo, reguliuodamas Th limfocitų aktyvumą. Keles ir kt. nustatė, reikšmingas sąsajas tarp vitamino D kiekio ir Th1/Th2 pusiausvyros bei neigiamą ryšį tarp vitamino D ir bendro IgE kiekio alerginio rinito metu [295]. Mūsų rezultatai atskleidžia sumažėjusio vitamino D kiekio ryšį su didėjančiu Th2 ir Th1 limfocitų kiekiu atopijos metu, kai kurie tyrimai rodo, kad vitaminas D aktyvina Th2 ląstelių vystymąsi, skatindamas citokino IL-4 gamybą ir blokuoja Th1 ląstelių aktyvumą, slopindamas IFN- γ gamybą, taip ribodamas galimą audinių pažeidimą, kurį sukelia Th1 limfocitų aktyvumas [290,291]. Nustatytas neigiamas ryšys tarp vitamino D kiekio ir Th17 limfocitų, kurie dalyvauja uždegimo aktyvinime, sutampa su kitų tyrimų rezultatais ir prisideda prie duomenų, detaliau atskleidžiančių vitamino D vaidmenį atopijos patogenezėje [167,206]. Tyrimai atskleidžia, kad IL-17 gali dalyvauti aktyvinant Th2 limfocitus [81], prisidėti prie eozinofilų ir neutrofilų infiltracijos skatinimo bei Treg limfocitų atsako slopinimo [82]. Tikėtina, kad vitaminas D, slopindamas Th17 limfocitų veikimą, aktyvina Th2 limfocitų slopinimą ir gali prisidėti reguliuojant eozinofilų ir neutrofilų infiltraciją. Vis dėlto nustatytas ryšys tarp vitamino D ir Th limfocitų kiekio nebuvo stiprus, o tyrimo rezultatai neparodė reikšmingo ryšio tarp vitamino D ir Treg limfocitų kiekio ar Th17 ir Treg limfocitų santykio. Remiantis kitų mokslininkų duomenimis [82], galima spėti, kad vitaminas D Treg limfocitus veikia ne tiesiogiai, bet per Th17 limfocitus, slopindamas jų aktyvumą. Vis dėlto galimas to paaiškinimas: lengvos ar vidutinio sunkumo atopinių ligų formos nepakankamai atspindi asociaciją tarp vitamino D ir Th limfocitų, ypač Treg limfocitų.

Atlikto tyrimo metu nustatytas reikšmingai didesnis bendro IgE ir kraujo eozinofilų kiekis sergančiųjų atopinėmis ligomis grupėse, nei kontrolinėje grupėje. Be to, nustatytos reikšmingos sąsajos tarp padidėjusio eozinofilų skaičiaus ir sumažėjusio vitamino D kiekio atopijos metu. Tokie rezultatai atskleidžia, kad vitaminas D gali būti potencialus IgE ir eozinofilų kiekio reguliatorius. Vitaminas D gali prisidėti prie IgE ir eozinofilų kiekio reguliavimo, slopindamas Th2 limfocitų atsaką ir mažindamas IL-5 gamybą, kuris yra ypač reikšmingas alerginio fenotipo pasireiškimui [67]. Gauti tyrimo duomenys sutampa su kitų mokslininkų rezultatais, atskleidžiančiais sumažėjusio vitamino D kiekio ryšį su padidėjusiu eozinofilų kiekiu kraujyje sergant

atopinėmis ligomis ar astma [173,174]. Be to, negalima atmesti galimybės, kad vitamino D poveikį eozinofilams gali reguliuoti vitamino D receptoriai. Vitaminas D, veikdamas per VDR, esančius eozinofilų paviršiuje, gali prailginti eozinofilų gyvenimo trukmę ir padidinti membraninių receptorių ekspresiją, taip slopindamas ląstelių apoptozę ir sumažindamas naujų eozinofilų poreikį [24]. Nors mes nenustatėme reikšmingo ryšio tarp vitamino D ir IgE kiekio, kiti tyrimai parodė, kad žema vitamino D būklė yra susijusi su didesniu IgE kiekiu atopijos metu [175,176,178]. Kai kurie mokslininkai teigia, kad asmenims, kuriems trūksta vitamino D, nustatomas didesnis IgE kiekis ir eozinofilų skaičius, nei tiems, kurių vitamino D kiekis yra pakankamas [173,296,297], nors literatūros šaltiniuose pateikiami ir priešaringi tyrimų rezultatai [181,182].

Taip pat nustatytas teigiamas ryšys tarp vitamino D ir citokino IL-33 kiekio sergančiųjų atopinėmis ligomis grupėje. Tokie rezultatai sutampa su mokslininkų tyrimais, atskleidžiančiais reikšmingą vitamino D veikimą skatinant IL-33 gamybą, taip pat šio citokino receptoriaus ST2 ekspresiją žmogaus keratinocituose [298]. IL-33 – tai naujas citokinas, kurį gamina dauguma organų, įskaitant odos, epitelio ir endotelio ląsteles. Šis citokinas dalyvauja reguliuojant imuninį atsaką, žinoma, kad jis aktyvuoja Th2 limfocitus, putliąsias ląsteles ir eozinofilus [136]. Be to, tyrimo rezultatai atskleidė tiesiogines sąsajas tarp IL-33 ir Th1/Th2 limfocitų santykio bei IL-17A ir netiesioginį ryšį su IFN- γ . Tai suteikia tam tikrą paaiškinimą apie mechanizmą, kaip vitaminas D gali būti susijęs su Th2 limfocitų atsako skatinimu, ir sutampa su tyrimais, kuriuose daromos išvados, kad vitaminas D skatina Th2 ląstelių vystymąsi, taip blokuodamas Th1 ląstelių aktyvavimą, slopindamas IFN- γ gamybą, taip ribodamas galimą audinių pažeidimą [290,291]. Vis dėlto gauti rezultatai parodė neigiamą koreliaciją tarp vitamino D ir Th2 limfocitų bei IL-5 kiekio. Tokie rezultatai rodo, kad vitaminas D gali dalyvauti keliuose skirtinguose mechanizmuose, reguliuojančiuose Th2 limfocitų atsaką ir netiesiogiai prisidėti slopinant ar aktyvinant Th2 limfocitus, taip reguliuojant kitų limfocitų aktyvumą. Svarbu paminėti, kad vitamino D veikimas moduluojant IL-33 ekspresiją gali būti reikšmingai susijęs su VDR, esančiais ant keratinocitų [298]. Vis dėlto kelių tyrimų duomenys atskleidė tai, kad vitaminas D gali būti susijęs su atopinių ligų sunkumu ir išsivystymu, nepriklausomai nuo IL-33 veikimo [299,300].

4.5. Vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genu polimorfizmas ir bendro IgE, kraujo eozinofilų kiekis atopijos metu

Atlikto tyrimo metu nustatyta, kad *VDR* geno VNP rs11168293 alelis T buvo susijęs su nustatytu mažesniu bendro IgE ir kraujo eozinofilų kiekiu

atopijos metu, tuo tarpu rs11168293 alelis G, priešingai, buvo reikšmingai susijęs su didesniu kraujo eozinofilų kiekiu. Be to, pastebėta tendencija, kad sergantiesiems atopija, kurie turėjo rs11168293 genotipą GG, buvo nustatytas didesnis eozinofilų kiekis, nei tiems, kurie turėjo kitus šio polimorfizmo genotipus. Skirtingai nei eozinofilai [24], IgE neturi VDR, tačiau IgE kiekis kraujyje yra priklausomas nuo B limfocitų kiekio ir funkcinio aktyvumo [221]. Todėl galima teigti prielaidą, kad *VDR* geno polimorfizmas rs11168293 gali būti susijęs su B limfocitų reguliavimu. Be to, Th2 limfocitų gaminami citokinai IL-4 ir IL-13 aktyvina B limfocitų proliferaciją ir IgE sintezę, o IL-5 svarbus eozinofilų aktyvacijos procesuose [66]. Tikėtina, kad rs11168293 gali būti susijęs su atopijos patogenezės procesais ir dalyvauti reguliuojant Th2 limfocitų aktyvumą, taip prisidėdamas prie IgE ir eozinofilų kiekių sumažėjimo ar padidėjimo. Gauti duomenys patvirtina mokslininkų keliamą hipotezę, kad vitaminas D ir tam tikri *VDR* geno polimorfizmai gali sutrikdyti Th2 ląstelių atsaką ir skatinti atopijos vystymąsi [230]. Deja, rs11168293 variantas yra mažai ištirtas ir, mūsų žiniomis, nėra paskelbtų straipsnių apie *VDR* rs11168293 vaidmenį atopinių ligų kontekste. Norint patvirtinti mūsų rezultatus, reikia toliau tirti *VDR* geno VNP rs11168293 variantą, atliekant tyrimus su didesnėmis imtimis ir skirtingose populiacijose. Kiti mokslininkai nustatė reikšmingą ryšį tarp *VDR* geno polimorfizmų rs2239185, rs 7975232 ir rs731236 ir IgE kiekio astmos ir atopijos metu [229,238]. Vis dėlto, mes neradome jokio reikšmingo ryšio tarp šių geno polimorfizmų.

Gauti rezultatai parodė reikšmingą ryšį tarp vitamino D surišancio baltymo *GC* geno VNP rs7041 genotipo CC ir atopijos metu nustatyto didesnio eozinofilų kiekio, palyginus su šio polimorfizmo AA genotipu. Be to, rs741 alelio C nešiotojams nustatytas didesnis kraujo eozinofilų ir bendro IgE kiekis, nei tiems, kurie alelio C neturėjo. Tokie rezultatai sutapo su Vokietijos mokslininkų atlikto tyrimo rezultatais, kai nustatytas reikšmingas ryšys tarp rs7041 ir IgE kiekio sergant astma [22]. Fawzy su bendraautorais atliktas tyrimas taip pat parodė, kad rs7041 GG genotipas ir G alelis yra galimi astmos išsivystymo rizikos veiksniai bei nustatė, kad rs4588 AA genotipas ir A alelis galimai atlieka apsauginį vaidmenį sergant bronchine astma [25]. Vis dėlto atlikto tyrimo rezultatai parodė, kad rs4588 genotipas TT ir alelis T buvo susijęs su nustatyto didesniu eozinofilų kiekiu atopijos metu. Tokie tyrimų rezultatai parodo, kad vitamino D surišantis baltymas yra ne tik vitamino D metabolitų nešiklis, gali dalyvauti uždegimo moduliavime [142,250]. Gauti rezultatai rodo, kad vitamino D surišantį baltymą koduojančio *GC* geno VNP, tokie kaip rs7041 ir rs4588, gali būti reikšmingai susijęs su alergenu sukeltu uždegimu.

4.6. Vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genu polimorfizmas ir T limfocitų potipių bei jiems būdingų citokinų kiekis atopijos metu

Mokslininkų pateikti duomenys rodo, kad VDR gali prisidėti reguliuojant imuninį atsaką ir slopinti T limfocitų dauginimąsi [231] bei jų funkcinį aktyvumą [231–234]. Toks VDR vaidmuo gali būti susijęs su tam tikrais šio receptoriaus geno polimorfizmais. Gauti rezultatai atskleidė reikšmingas sąsajas tarp *VDR* geno VNP rs731236 genotipo AA ir atopijos metu padidėjusio Th2, Th17 limfocitų kiekio bei Th1/Th2 santykio. Tai leidžia kelti hipotezę, kad rs731236 genotipas AA gali būti susijęs su aktyvesniu uždegimu atopijos metu ir sunkesne atopinių ligų eiga. Be to, rs731236 genotipas AA buvo reikšmingai susijęs su mažesniais TGF- β 1, o genotipas GG – su mažesniais IL-10 kiekiais, kurie yra susiję su Treg limfocitų aktyvumu ir imuninio uždegimo slopinimu. Galima teigti, kad toks ryšys atspindi susilpnėjusią Treg limfocitų funkciją, nors sąsajų tarp rs731236 ir Treg limfocitų kiekio nenustatyta. Be to, šie rezultatai papildė mokslininkų pateiktus duomenis apie *VDR* geno VNP rs731236 ryšį su tokių ligų kaip astmos rizika [280].

Atopijos grupėje, *VDR* geno VNP rs11168293 alelio T nešiojams buvo nustatytas mažesnis IgE ir kraujo eozinofilų kiekis, nei tiems, kurie neturėjo šio alelio. Tuo tarpu tiems, kuriems aptiktas rs11168293 alelis G, nustatytas didesnis kraujo eozinofilų kiekis, nei tiems, kurie neturėjo šio alelio. Sąsajos tarp rs11168293 genotipo TT bei alelio T ir IL-10, IgE, eozinofilų rodiklių atskleidžia apsauginį šio VNP poveikį atopijos patogenezėje. Vis dėlto *VDR* polimorfizmų ryšys su T limfocitų populiacijomis ir jų ekspresuojamais citokinais nėra detalčiai išaiškintas. Tačiau VDR buvimas imuninėse ląstelėse rodo [222], kad vitamino D veikimas gali būti susijęs su šių ląstelių aktyvumu. Manoma, kad vitamino D prijungimas prie VDR ant putliųjų ląstelių sukelia citokino IL-10 gamybą, kuris slopina IIL-1B, IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α ir kitų citokinų išskyrimą ir taip reguliuoja imuninį uždegimą (301). Putliosios ląstelės yra efektorinės ląstelės, kurios vaidina lemiamą vaidmenį aktyvinant nuo IgE priklausomą uždegimą atopijos metu, todėl vitamino D veikimas per VDR, esantį ant putliųjų ląstelių, gali būti susijęs su Th2 ir kitų CD4⁺ T limfocitų potipių aktyvumu. Vis dėlto rs11168293 TT genotipas taip pat buvo susijęs su padidėjusiu Th1/Th2 santykiu, todėl į šio VNP vaidmenį reguliuojant Th2 limfocitų kiekį ir aktyvumą reikėtų žiūrėti kritiškai. Be to, nustatytas rs11168293 ryšys su IL-10 gali turėti reikšmės IL-10, ST2 receptoriaus ir IL-33 kaskados veikimui, kuris skatina Th2 imuninį atsaką [130].

Galima spėti, kad gautiems rezultatams reikšmės turėjo ne tik *VDR* geno VNP, bet ir VDR kiekis ląstelėse. Yra duomenų atskleidžiančių ryšį tarp VDR ekspresijos T limfocituose ir IFN- γ , todėl galima teigti, kad padidėjusi VDR

ekspresija yra susijusi su vykstančiu uždegimu [302]. Bendix ir kt. atliko tyrimą, kurio tikslas buvo ištirti gydymo vitaminu D poveikį VDR ekspresijai T limfocituose pacientams, sergantiems krono liga [302]. Siekiant įvertinti citoplazminio ir branduolinio VDR kiekį, iš periferinio kraujo išskirtos mononuklearinės ląstelės buvo stimuliuotos anti-CD3/CD28 ir nudažytos naudojant fluorochromu žymėtus VDR antikūnus ir įvertintos tėkmės citometrijos metodu. Gauti rezultatai parodė, kad stimuliuotos T ląstelės gamino didelį VDR kiekį, kuris buvo sumažintas veikiant aktyviu vitaminu D [302]. Tokie duomenys parodo, kad vitaminas D gali reguliuoti T limfocitų atsaką per VDR ir taip reguliuoti uždegimą skatinančius mechanizmus. Tačiau yra prieštaringų duomenų, rodančių, kad vitaminas D stimuliuoja VDR ekspresiją CD4+ T limfocituose [303]. Vis dėlto Chang ir kt. atlikto tyrimo rezultatai atskleidė, kad pelių, sergančių autoimuniniu encefalitu, gydymas aktyviu VDR ligandu ir vitamino D papildais sumažino IL-17 ekspresiją ir palengvino ligos raišką [16]. Tyrimas taip pat parodė, kad *in vitro* CD4+ T limfocitų veikimas fiziologinėmis vitamino D dozėmis pirmiausia slopino Th17 ląstelių citokinų gamybą, priklausomai nuo VDR, nepaveikdamas transkripcijos veiksmų ar paviršiaus molekulių gamybos [16]. Tokie rezultatai parodė, kad VDR veikimas yra reikšmingai susijęs su Th17 limfocitų slopinimu.

Tyrimo rezultatai parodė, kad atopijos metu nustatytas GC geno VNP rs4588 genotipas GG buvo susijęs su mažesniais Th2 ir Th17 limfocitų kiekiais, nei turint kitus šio polimorfizmo genotipus. Be to, rs4588 TT genotipas buvo susijęs su nustatomais mažesniais IL-10 kiekiais serume, nei turint šio VNP GT genotipą. Tokie rezultatai rodo, kad rs4588 genotipas GG gali atlikti apsauginį vaidmenį ir reikšmingai dalyvauti slopinant alerginį uždegimą atopijos metu. Svarbu paminėti, kad rs4588 genotipas GG dažniau buvo būdingas sergantiems atopinėmis ligomis, kuriems buvo nustatytas normalus vitamino D kiekis, nei tiems, kuriems nustatytas sumažėjęs vitamino D kiekis. Tokie rezultatai parodo, kad GC geno polimorfizmai, koduojantys vitaminą D surišantį baltymą, yra susiję su vitamino D kiekiu ir taip gali dalyvauti imuninio atsako reguliavime. Nėra daug tyrimų, kuriuose būtų analizuojamos sąsajos tarp GC geno polimorfizmų ir imuninio atsako atopijos metu, tačiau paskelbti duomenys rodo, kad tokių atopinių ligų kaip astma metu vitamino D kiekis yra teigiamai susijęs su GC baltymu, Treg limfocitų skaičiumi, ir neigiamai – su bendru IgE ir IL-4 kiekiu [7].

Tuo tarpu rs7041 genotipo CC sąsajos su periferiniame kraujyje nustatytais didesniais Th2 ir Th17 limfocitų kiekiais bei mažesniu TGF-β1 kiekiu serume atopijos metu, nei esant kitiems šio polimorfizmo genotipams, atskleidžia galimą šio VNP vaidmenį aktyvinant imuninį atsaką ir alerginį uždegimą atopinių ligų kontekste. Be to, kaip buvo minėta, atopijos metu nustatytas rs7041 alelis C buvo susijęs su padidėjusiu IgE ir eozinofilų kiekiu. Rs7041

genotipas CC taip pat buvo susijęs padidėjusiais IL-10 ir IL-35 rodikliais. Tokie rezultatai atskleidžia, kad šis VNP iš dalies prisideda prie Treg limfocitų aktyvumo reguliavimo.

Gauti rezultatai taip pat atskleidė, kad tiriamiesiems, kuriems nustatytas rs3733359 GG, buvo nustatytas reikšmingai mažesnis IL-10 kiekis, nei turintiems šio VNP GT genotipą. Remiantis gautais rezultatais ir kitų tyrimų duomenimis [148,252,253], galima teigti, kad tam tikri vitamino D surišanti baltymą koduojančio *GC* geno polimorfizmai atlieka reikšmingą vaidmenį imuninės sistemos reguliavime, slopinant VDR signalizaciją imuninėse ląstelėse, ir gali riboti vitamino D sąveiką su Th2, Th17, Treg ir kitais limfocitais bei dalyvauti kontroliuojant vitamino D metabolitų patekimą į ląsteles. Vis dėlto reikšmingo ryšio tarp šio polimorfizmo ir vitamino D kiekio nustatyta nebuvo, todėl svarbu atlikti daugiau tyrimų, kuriuose būtų analizuojamas ryšys tarp įvairių *GC* geno polimorfizmų ir imuninio atsako atopijos metu.

IŠVADOS

1. Sergant atopinėmis ligomis (atopiniu dermatitu ir alergine astma) nustatytas mažesnis vitamino D kiekis kraujyje nei kontrolinėje (sveikų asmenų) grupėje.
2. Identifikuoti šeši vitamino D receptoriaus geno ir keturi vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmai, kurių pasiskirstymas tarp atopijos ir kontrolinės grupių reikšmingai nesiskyrė; tačiau atopijos metu nustatytos sąsajos tarp sumažėjusio vitamino D kiekio ir vitamino D receptoriaus geno polimorfizmo rs11168293 GG genotipo bei vitamino D surišančio baltymo geno polimorfizmo rs4588 T alelio. Kontrolinėje grupėje nustatytas ryšys tarp normalaus vitamino D kiekio ir polimorfizmų rs3847987 AA, rs731236 GG ir rs2228570 GG genotipų.
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 sumažėjęs 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 kieki, atsižvelgiant į tirtų genų polimorfizmų variantus, nustatyta, kad:
 - Esant vitamino D receptoriaus geno polimorfizmo rs11168293 aleliui G ar vitamino 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 vitamino D surišančio baltymo geno polimorfizmo rs4588 genotipui AA nustatytas padidėjęs Th2 ir Th17 kiekis, o rs7041 genotipui CC – padidėjęs Th2, Th17, IL-10, IL-35 ir sumažėjęs TGF-β1 kiekis kraujyje.

TYRIMO APRIBOJIMAI

Tyrimo rezultatams galėjo turėti įtakos kai kurie veiksniai. Kraujo mėginiai buvo renkami nuo rugsėjo iki balandžio mėnesio, kai dėl mažesnės saulės spinduliuotės vitamino D lygis natūraliai mažėja. Tačiau nebuvo atsižvelgta į daugelį veiksnių, tokių kaip asmeninis gautas saulės spinduliuotės kiekis, sezoniniai vitamino D svyravimai, dieta, mitybos įpročiai, kūno svoris ir kūno masės indeksas, kurie galėjo daryti įtaką rezultatams. Taip pat tyrimo vykdymas COVID-19 pandemijos metu galėjo paveikti gautus rezultatus dėl pasikeitusio tiriamųjų kasdienio gyvenimo: socialinės izoliacijos, mažesnio fizinio aktyvumo, galimai mažesnio saulės spinduliuotės kiekio. Be to, neįtrauktos galimos sąveikos su kitais genais, dalyvaujančiais vitamino D metabolizme, kurie galėtų turėti papildomą poveikį. Šių veiksnių neįtraukimas gali riboti išvadų išsamumą. Todėl būsimuose tyrimuose svarbu ištirti šias sąveikas, kad būtų geriau suprasta atopinių ligų patogenezė ir genetinių bei aplinkos veiksnių įtaka. Be to, atopinės ligos yra dinamiškos ir gali kisti laikui bėgant, todėl būtina nuolat stebėti ir gilintis į jų etiologiją, naudojant įvairesnius tyrimo metodus. Svarbu tai, kad šis tyrimas apima tik Lietuvos gyventojus. Unikali šios populiacijos genetinės, aplinkos ir kultūrinės sąvybės gali turėti įtakos rezultatų apibendrinimui ir gautoms išvadoms. Be to, duomenų apie atliktus tyrimus Europos populiacijoje yra nedaug, todėl gautus duomenis reikėtų lyginti su tyrimų atliktų kitose populiacijose, turinčiose skirtingą genetinį ir aplinkos kontekstą, duomenimis.

SUMMARY

INTRODUCTION

Atopy is a genetic predisposition to type I hypersensitivity diseases such as atopic dermatitis (AD) or allergic asthma (AA), characterized by excessive production of immunoglobulin E (IgE) [1]. It is a complex and heterogeneous condition in which symptoms such as bothersome itching, reddening of the skin, respiratory distress, and others may occur, depending on the specific atopic disease mechanism [2,3]. The prevalence of atopy has increased rapidly over the past few decades [4]. About 20 % of the world's population suffers from atopic diseases, and the increasing prevalence of these diseases poses new challenges for scientists and healthcare professionals [4]. Additionally, the marked heterogeneity in the pathogenesis and etiology of atopic diseases is becoming an increasingly urgent problem.

Genetic factors, environmental exposures, immune responses, and interactions among these elements are involved in the onset and progression of atopy [5,6]. Vitamin D, obtained through diet and environmental exposure to solar radiation, is thought to play a role in regulating the immune response [7]. However, genetic factors that may influence the development of atopic conditions should also be considered. Recent studies reveal that single nucleotide polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) and vitamin D-binding protein (GC, also known as VDBP) genes and their single nucleotide polymorphisms (SNPs) may be significantly associated with the pathogenesis of atopy [8–10].

A major dominant mechanism in the pathogenesis of atopy has been attributed to an increased type 2 helper T lymphocyte (Th2) immune response [3,11]. However, the different clinical manifestations of atopy may be characterized by various immune response mechanisms that are not fully understood. Recent clinical studies reveal that not only Th2 lymphocytes play a significant role in the pathogenesis of atopy, but also other subtypes of T lymphocytes, such as Th17 and T regulatory (Treg) lymphocytes [3,12,13]. Th17 lymphocytes, together with Th2 lymphocytes, are believed to promote immune inflammation, while Treg lymphocytes and the cytokines they produce play a significant role in suppressing inflammation [12,14,15]. Therefore, to clarify the nature of immune response mechanisms during atopy, it is important to consider the activity of not only Th2 lymphocytes but also other T lymphocyte subtypes and the cytokines they produce.

It is assumed that vitamin D is significantly involved in the regulation of the proliferation and differentiation of Th lymphocytes and is related to the processes of cytokine synthesis [7]. Research has revealed that vitamin

D regulates the Th1/Th2 balance, suppresses Th17 lymphocyte responses, and promotes Treg lymphocyte activity, thereby suppressing inflammation [16–19]. Additionally, a meta-analysis revealed that certain SNPs in the *VDR* gene may be associated with increased susceptibility to allergic diseases [21]. SNPs in the *VDR* and *GC* genes may also be related to the regulation of vitamin D metabolism and its levels [8,20]. It is hypothesized that vitamin D and the SNPs of the *VDR* and *GC* genes involved in its metabolism may be significantly related to the expression of atopy. However, there are not enough data to unequivocally support this hypothesis, and the relationship between immune cells and cytokines involved in the regulation of inflammation with vitamin D levels and SNPs in the *VDR* and *GC* genes has not been fully elucidated.

To improve the control of atopic diseases, it is important to clarify the pathogenesis of these conditions and identify potential atopy-provoking factors. Identifying SNPs in *VDR* and *GC* genes and assessing their connections with the expression of immune response components would help to understand the development of atopy in more detail. This knowledge could provide a basis for the introduction of new diagnostic methods and treatments.

Aim

To determine the significance of vitamin D receptor and vitamin D-binding protein gene polymorphisms for the immune response during atopy.

Task

1. To examine the vitamin D levels in the group of patients with atopic diseases and compare them with data from the control group.
2. To identify polymorphisms in the vitamin D receptor gene and the vitamin D-binding protein gene and assess their relationship with vitamin D levels in the presence or absence of atopy.
3. To determine the levels of immune markers (total IgE, blood eosinophils, T lymphocytes, and associated cytokines) during atopy and evaluate their relationship with vitamin D.
4. To evaluate the immune marker profile while considering the variants of the vitamin D receptor and vitamin D-binding protein gene polymorphisms.

The novelty of the study

Atopic diseases, including AD and AA, are characterized by a complex immune response involving T lymphocyte subtypes and related cytokines [3,12]. The activity of these cells may be mediated by genetic and environmental factors [6] as well as vitamin D [7]. It is assumed that SNPs in *VDR* and *GC*

genes are related to the action of vitamin D and, consequently, play a role in regulating the immune response [8,20]. However, there is not enough data to unequivocally support the hypothesis about the relationship between T cells profile and *VDR* or *GC* SNPs.

During this study, a comprehensive analysis of single nucleotide polymorphisms in the vitamin D receptor and vitamin D-binding protein genes was conducted in patients with atopic diseases (atopic dermatitis or allergic asthma) and a control group. This represents a valuable contribution to understanding the role of genetic mechanisms in the pathogenesis of atopic diseases. The potential associations between the expression of the immune response, vitamin D, and different genetic variants of genes involved in its metabolism highlight the multifaceted role of vitamin D in modulating the immune response. The identification of *VDR* and *GC* gene polymorphisms and their assessment in relation to the immune response in the context of atopy opens up possibilities for personalized medicine and could form the basis for new diagnostic methods for atopic diseases, providing a foundation for tailored interventions based on an individual's genetic profile. Furthermore, this is the first study analyzing the relationship between *VDR* and *GC* gene SNPs and immune response mechanisms during atopy in the Lithuanian population, and it is expected to pave the way for new horizons in future research in this field.

Practical value of the study

The study results provide more comprehensive data on the role of vitamin D in regulating immune responses during atopy. They suggest that it is advisable to assess vitamin D levels in patients with atopic diseases and, if necessary, recommend vitamin D supplementation. The use of this vitamin alongside other immunomodulatory medications may be significant in more effectively regulating immune inflammation during atopic conditions.

The findings reveal the significant role of *VDR* and *GC* gene polymorphisms in regulating vitamin D levels. It was determined that certain gene variants were associated with decreased vitamin D levels in individuals with atopic diseases, while others were more common in those with normal vitamin D levels. This suggests that *GC* and *VDR* gene polymorphisms can influence vitamin D levels. Individuals who carry certain gene variants or, conversely, lack specific variants of these genes, may require higher doses of vitamin D or more frequent supplementation to achieve therapeutic effects. Considering the *VDR* and *GC* gene polymorphisms and vitamin D levels, individually tailored vitamin D dosing could be beneficial in controlling atopic diseases and addressing the growing prevalence of vitamin D deficiency.

The study results provide new insights into the significance of *VDR* and *GC* gene polymorphisms in the immune response during atopy. The findings indicate that gene polymorphisms may influence the manifestation of the immune response. This could serve as a marker for assessing phenotypes of atopic diseases, which is important for selecting personalized treatments. The study's results may also contribute to predicting the risk of developing atopic diseases, with particular attention to the patient's genetic profile, and be useful in optimizing vitamin D usage and controlling the inflammatory process.

Author's Contribution

The author was actively involved in all stages of the study, from scientific literature analysis to laboratory tests and summarization of the obtained results. Below are the stages of the study independently conducted by the author:

- Conducted a scientific literature review and successfully prepared the protocol for the Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee.
- Developed research project proposals and secured funding from the Lithuanian University of Health Sciences research fund.
- Prepared the research materials (blood and serum samples) for analysis, from which laboratory tests were conducted: flow cytometry (isolation, preparation, and assessment of T lymphocytes), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (determination of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine levels; determination of IgE and vitamin D levels).
- Performed the analysis of identified gene polymorphisms and interpretation of the results.
- Conducted analysis and summarization of the research results.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted from 2020 to 2024 at the Immunology and Allergy Clinic of the Medical Academy of the Lithuanian University of Health Sciences, with approval from the Regional Biomedical Research Ethics Committee, Approval No. BE-2-74 (Appendices 1 and 2).

Some of the study data were collected as part of an international project titled "Comparative Study of Vitamin D and Its Receptor Gene Polymorphisms Among Children and Adults with Atopic Dermatitis and Asthma in Lithuania, Latvia, and Taiwan." Permissions from international partners were obtained to use data collected by Lithuanian researchers for the project (Appendices 3 and 4).

The study was partially funded by the Lithuanian University of Health Sciences Foundation and the Research Council of Lithuania (Project registration No. P-LLT-20-4).

In the first phase of the study, all participants had their vitamin D levels, vitamin D receptor gene, and vitamin D-binding protein gene polymorphisms assessed, as well as total IgE levels and leukocyte populations.

In the second phase, using appropriate statistical methods and proportionally formed groups, the immune response markers (T lymphocyte and their characteristic cytokines profile) were evaluated for a subset of participants.

Study population

The group of patients with atopic diseases consisted of 185 individuals diagnosed with mild to moderate atopic dermatitis and mild to moderate allergic asthma. These patients were examined and consulted at the Immunology and Allergy Clinic of Kaunas Clinics, Lithuanian University of Health Sciences, between September 2020 and April 2023. The diagnosis of AD was based on the Hanifin and Rajka criteria [260], with disease severity assessed using the SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis) index. Individuals with AA were diagnosed and classified according to the recommendations of the Global Initiative for Asthma (GINA) [261]. Sensitization to allergens was determined according to the EAACI guidelines [262]. The control group consisted of 81 healthy individuals who were not sensitized to allergens and had no atopic diseases or other conditions that could impact the study results.

General inclusion criteria:

- adults over 18 years old,
- no vitamin D supplements for at least three months,
- no acute or chronic respiratory diseases (other than asthma),
- no systemic autoimmune diseases or malignant diseases.

Additional inclusion criteria for the control group:

- no allergy symptoms present.

General exclusion criteria:

- individuals under 18 years old,
- treatment with allergen immunotherapy,
- pregnancy.

All participants who agreed to join the study were informed about the study protocol and signed an informed consent form.

Sample collection and storage

Samples were collected from subjects during venipuncture. All subjects underwent a physical examination, assessment of sensitization to allergens, spirometry (to assess lung function), and peripheral blood sampling (for

determination of total immunoglobulin E (IgE), vitamin D levels, assessment of *VDR* and *GC* genes single nucleotide polymorphisms, assessment of inflammatory and anti-inflammatory cytokines, and determination of T lymphocyte profile).

For the evaluation of whole blood and determination of the *VDR* and *GC* genes SNPs, blood was collected in test tubes with the anticoagulant potassium ethylene-diamine-tetra-acetic acid (K2EDTA). These test tubes for genetic testing were frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the tests were performed. Samples for the evaluation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, as well as for the determination of total IgE and vitamin D levels in the blood, were collected in serum tubes. These tubes were centrifuged at 3500 rpm for 10 min., and the serum was separated and frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until laboratory tests. For T lymphocyte profile analysis, the subjects' blood was collected in tubes with lithium heparin, without gel, and the tests were performed on the collected blood samples without refrigeration.

Evaluation of peripheral blood

A general blood test and evaluation of individual leukocyte populations were performed using an automatic hematological analyzer, the UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System (Beckman Coulter, Miami, USA), at the Laboratory Medicine Clinic of Kaunas Clinic, Lithuanian University of Health Sciences.

Evaluation of vitamin D and total IgE concentration in blood serum

The amount of vitamin D in the blood of the subjects was determined by measuring the concentration of 25(OH)D in the serum using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, following the manufacturer's standardized methodology with commercial reagent kits (BioVendor, Brno, Czech Republic). The sensitivity of the test is 2.81 ng/mL. According to the manufacturer's recommendations, the guidelines of the International Society of Endocrinology [263] and literature [151,153,264], data analysis was performed based on vitamin D levels: deficiency $< 20\text{ ng/mL}$ ($< 50\text{ nmol/L}$), insufficiency 20–30 ng/mL (50–75 nmol/L), normal 30–50 ng/mL (75–125 nmol/L).

Measurements of serum total IgE were performed by ELISA using a commercial kit (IBL International, Hamburg, Germany). The coefficients of variability for the accuracy of the analysis during the study were 4.1 %. The sensitivity of the test is 0.8 kU/L. Elevation of serum total IgE in adult subjects was defined as results exceeding the manufacturer's cutoff of 100 IU/mL. [265].

Determination of VDR and GC Genes SNPs

For the analysis of *VDR* and *GC* gene SNPs, DNA was extracted from the subjects' peripheral blood using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Six SNPs in the *VDR* gene (rs7975232, rs1544410, rs731236, rs3847987, rs2228570, rs11168293) and four in the *GC* gene (rs4588, rs7041, rs4725, rs3733359) were analyzed using TaqMan single nucleotide polymorphism genotyping assay probes (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). The tests were conducted at the Clinic of Genetics and Molecular Medicine of the Medical Academy of the Lithuanian University of Health Sciences, following the methodological instructions provided by the manufacturer.

Assessment of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines

Interleukin (IL) 5, IFN- γ , IL-17A, IL-10, TGF- β 1, IL-35, and IL-33 serum measurements were performed by ELISA using commercial kits from Elabscience Biotechnology Inc. (Huston, USA) with the Euroimmun Analyzer I (Lübeck, Germany).

Measurements were conducted using ELISA kits consisting of 96-well plates coated with specific antibodies against the respective human cytokines. Secondary antibodies were labeled with biotin and conjugated with streptavidin-HRP.

Before testing, frozen samples were thawed at room temperature and centrifuged to remove sediment. Kit reagents were warmed to room temperature and prepared according to the manufacturer's recommendations. TGF- β 1, which is normally present in an inactive form, was activated using kit activation reagents (1M HCl and 1.2M NaOH/0.5M HEPES) prior to assay.

The sensitivity of the assay measurements was: IL-5 – 9.38 ng/mL, IFN- γ – 9.38 ng/mL, IL-17A – 18.75 ng/mL, IL-10 – 0.94 ng/mL, TGF- β 1 – 0.1 ng/mL, IL-35 – 9.38 ng/mL, IL-33 – 9.38 ng/mL. The intensity of the reaction was measured spectrophotometrically at a wavelength of 450 nm \pm 2 nm. The coefficients of variability for the accuracy of the analysis during the study were < 10 %. Serum TGF- β 1 was measured in ng/mL, while other cytokines were measured in pg/mL.

Analysis of immune cells – T lymphocyte subtypes

Peripheral blood was collected in gel-free lithium heparin tubes. To ensure cell viability, mononuclear cells were immediately isolated from the peripheral blood. Additionally, T helper (Th) lymphocytes Th1, Th2, Th17, and Treg lymphocytes were prepared for analysis by flow cytometry.

Isolation of mononuclear cells from peripheral blood

For the evaluation of T lymphocytes, mononuclear cells (PBMCs) were isolated from peripheral blood. Peripheral blood was diluted with saline solution in equal parts (2 mL of blood with 2 mL of saline solution). A high-density gradient (Ficoll Paque™; Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) was used for cell isolation. Into 50 mL Falcon-type test tubes (Thermo Fisher Scientific™, Massachusetts, USA), 4 mL of the high-density gradient was dispensed, and the diluted peripheral blood was gently layered on top.

The sample was centrifuged at $400 \times g$, 20 °C, for 15 min. without braking. After centrifugation, the upper fraction, containing the PBMCs, was gently collected with a sterile Pasteur pipette, avoiding mixing the layers. The mononuclear cell layer was transferred to a sterile centrifuge tube for washing to remove platelets and remnants of the density gradient. The cells were suspended in 2–3 mL of phosphate-buffered saline (PBS, BD Biosciences, San Diego, USA) and centrifuged at $100 \times g$, 20 °C, for 10 min. The supernatant was removed, and the cells were resuspended in 2–3 mL of RPMI 1640 complete cell culture medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Massachusetts, USA) and centrifuged again at $100 \times g$, 20 °C, for 10 min. After centrifugation, the supernatant was removed, and the cells were counted under a light microscope, with test samples containing approximately 1×10^6 cells/mL.

For the assessment of Treg lymphocytes, PBMCs were analyzed using a hypotonic lysing solution (BD FACS Lysing Solution, BD Biosciences, San Diego, USA) after erythrocyte lysis. 100 μ L of peripheral blood was mixed with 1 mL of lysis solution and kept at room temperature in the dark for 10 min. until erythrocyte lysis was clearly visible.

Preparation of Th1, Th2 and Th17 lymphocytes

Active subtypes of T lymphocytes were determined by the cytokines they secreted. Therefore, PBMCs were stimulated using a T cell activation cocktail with GolgiPlug reagent, which inhibits protein release from cells (Leukocyte Activation Cocktail with BD GolgiPlug™, BD Biosciences, San Diego, USA). The cell suspension was added to 1 mL of RPMI 1640 complete cell growth medium mixed with heat-activated bovine serum albumin (BSA) and streptomycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Massachusetts, USA), then 2 μ L of leukocyte activation reagent was added and incubated at 37 °C for 4 h.

After incubation, cells were washed: the cells were centrifuged at $250 \times g$, 20 °C, for 10 min., the supernatant was decanted, and the cells were

resuspended in 2 mL of RPMI 1640 complete medium. This washing step was repeated twice.

Following cell activation, cells were fixed and permeabilized for intracellular staining. The cell suspension was added to 1 mL of cell fixation buffer (BD Cytotfix™, BD Biosciences, San Diego, USA) and kept at room temperature in the dark for 15 min. After fixation, the cells were centrifuged at $250 \times g$, 20 °C, for 10 min., and the supernatant was decanted. The cells were washed twice with 2 mL of FBS Stain buffer (BD Biosciences, San Diego, USA) and centrifuged again at $250 \times g$, 20 °C, for 10 m. Fixed and washed cells were then suspended in 1 mL of permeabilization/wash buffer (BD Perm/Wash™, BD Biosciences, San Diegas, JAV) and kept at room temperature in the dark for 15 min. The cell suspension was centrifuged at $250 \times g$, 20 °C, for 10 min., the supernatant was discarded, and the cells were resuspended in 50 μ L of permeabilization buffer.

Activated cell populations were stained with fluorochrome-labeled monoclonal antibodies: anti-CD4-PerCP-Cy5.5, anti-IL-17A-PE, IFN- γ -FITC, IL-4 APC (Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit, BD Biosciences, San Diego, USA). 20 μ L of the antibody mixture was added to the suspension and incubated at room temperature in the dark for 30 min. Before flow cytometer analysis, the cell suspension was washed twice by adding 1 mL permeabilization/wash buffer, centrifuging at $250 \times g$, 20 °C, for 10 min., removing the supernatant, and resuspending the cells in 50 μ L FBS staining buffer.

During staining of activated cells with fluorochrome-labeled antibodies for evaluating Th1, Th2, and Th17 populations, a negative sample control was performed in parallel. Control samples were prepared by staining the test cell suspension with a three-color isotypic cocktail (BD Biosciences, San Diegas, JAV) consisting of human antibodies CD4-PerCP-Cy, mouse anti-mIgG1-FITC, mouse anti-mIgG1-PE, and rat anti-mIgG1-FITC. A negative sample control is designed to assess nonspecific staining with fluorescent antibodies directed against cellular antigens on target CD4+ lymphocytes that have been fixed and permeabilized. Nonspecific staining can result from nonspecific immunoglobulin and/or fluorochrome-mediated binding to cellular molecules, including immunoglobulin Fc receptors.

Preparation of T regulatory lymphocytes

For Treg cell analysis, 100 μ L of peripheral blood was mixed with 20 μ L of fluorochrome-labeled monoclonal antibodies for the detection of cell surface markers: anti-CD4-FITC and anti-CD25-APC (BD Biosciences, San Diego, USA). The blood with antibodies was kept at room temperature in the dark for 20 min. After incubation, the cell suspension was mixed with 1 mL

of hypotonic lysing solution (BD FASCS Lysing Solution, BD Biosciences, San Diego, USA) and kept at room temperature in the dark for 20 min., then centrifuged at $500 \times g$ for 10 min., and the supernatant was discarded. To remove lysis residues, the cells were mixed with 2 mL of FBS stain buffer (BD Biosciences, San Diego, USA) and centrifuged at $500 \times g$, 20 °C, for 5 min., and the supernatant was discarded.

After lysis and washing, cells were fixed in 1 mL of Human FoxP3 Buffer A (Human FoxP3 Buffer Set, BD Biosciences, San Diego, USA) at room temperature in the dark for 10 min. After fixation, to remove the fixation buffer, the cells were washed twice by mixing the suspension with 2 mL of FBS staining buffer and centrifuging at $500 \times g$, 20 °C, for 5 min., and the supernatant was decanted.

After gently suspending the cells in the remaining volume of the supernatant, cells were permeabilized by adding 0.5 mL of Human FoxP3 Buffer Solution (Human FoxP3 Buffer Set, BD Biosciences, San Diego, USA) and keeping them at room temperature in the dark for 30 min. After incubation, the cells were washed twice by mixing the suspension with 2 mL of FBS staining buffer and centrifuging at $500 \times g$, 20 °C, for 5 min., and the supernatant was decanted.

Cells were stained with the fluorochrome PE-labeled FoxP3 antibody (BD Biosciences, San Diego, USA) to detect the intracellular FoxP3 marker by adding 20 μ L of anti-FoxP3 to the suspension and incubating at room temperature in the dark for 30 min. After incubation, cells were washed twice by mixing the suspension with 2 mL of FBS staining buffer and centrifuging at $500 \times g$, 20 °C, for 5 min. The supernatant was then removed, and the cells were gently resuspended in 50 μ L of FBS staining buffer.

Assessment of lymphocyte phenotypes by flow cytometry

Determination of T lymphocyte populations was performed by flow cytometry using direct immunofluorescence. According to the instructions for use of the analyzer, verification controls were performed before the tests. To ensure internal control of the assays, compensation was performed as needed using the BDTM FC beads 7-color kit and BDTM FC beads 5-color kit (BD Biosciences, San Diego, USA), along with technical calibration using the BDTM CS&T Beads reagent (BD Biosciences, San Diego, USA). Proper compensation and calibration of the cytometer are important for controlling photomultiplier sensitivity, fluorescence compensation, positive and negative signal separation values, and laser alignment.

Analysis of the prepared samples was performed on a BD FACSLyric™ flow cytometry analyzer (BD Biosciences, San Diego, USA) using the BD FACSuite™ program v1.2.1 (BD Biosciences, San Diego, USA). The

analysis of lymphocyte subtypes was performed by delineating the boundaries of different subtypes, determined by the lateral and linear scattering profile of the laser light and the signal intensity of the samples stained with fluorochrome-labeled monoclonal antibodies. The subtypes of active T lymphocytes Th1, Th2, and Th17 were determined during the tests, in parallel with the control sample, and the amount of active Treg lymphocytes in the peripheral blood of the subjects was evaluated.

Results are expressed as a percentage of mononuclear cells isolated from peripheral blood.

Statistical analysis

The sample size was calculated using data from the pilot study and appropriate sample size calculation formulas. It was determined that the study should include at least 30 subjects.

Data were analyzed using IBM SPSS Statistics version 29 (IBM, USA) and Microsoft Excel 2017 (Microsoft Corporation, USA). Descriptive statistics for quantitative data are presented as means and standard error of the mean (SEM), and for qualitative data as frequencies and relative frequencies (%). The assumption of a normal distribution for quantitative data was tested using the Shapiro-Wilk test.

Spearman correlation coefficients (r) were calculated to determine linear relationships between quantitative variables. Correlation strength is considered weak if r is less than 0.3, medium if r values fall within the range of 0.3–0.75, and strong if r is greater than 0.75. Categorical data were assessed using the χ^2 (Chi-squared) test or Fisher's exact test for small sample sizes. Differences in the means of interval variables between two groups were compared using Student's t -test, and if the assumption of normality was not met, the Mann-Whitney U test was used. Means and variances of three groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA). For significant differences between groups, pairwise post-hoc comparisons were performed using Sidak's test. If the assumption of normality was not met, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used.

The chosen level of statistical significance (p) is $\alpha = 0.05$, with results considered statistically significant when $p < 0.05$. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CI) were calculated for allele and haplotype frequencies for the *VDR* and *GC* gene SNPs.

RESULTS

Clinical and demographic data

A total of 266 subjects (93 men and 172 women) were included in the study. Among these, 100 had moderate or mild atopic dermatitis, 85 had moderate or mild allergic asthma, and 81 constituted the control group. Basic characteristic of the subjects are presented in Table 1. The age and gender of the subjects did not differ statistically significantly between the groups. Blood eosinophil counts and total IgE levels were significantly higher in AD and AA groups compared to the control group. Patients with atopic diseases had statistically significantly lower vitamin D levels than the healthy individuals. Furthermore, serum vitamin D levels were lower in AD group compared to AA group.

Table 1. Basic characteristics of studied subjects

	Atopic dermatitis (n = 100)	Allergic asthma (n = 85)	Control (n = 81)
Male/female, n	31/69	30/54	32/49
Age (years)	29.51 ± 1	40.36 ± 1.5	35.57 ± 1.45
Total IgE, kU/L	919.83 ± 213 **	692.72 ± 170 *	24.99 ± 5.7
Vitamin D, ng/mL	24.11 ± 0.94^{†f}	18.37 ± 0.83**	27.23 ± 1.21
Peripheral blood cells:			
Leukocytes × 10 ⁹ /L	6.48 ± 0.16	6.38 ± 0.16	6.26 ± 0.14
Limfocytes × 10 ⁹ /L	1.89 ± 0.05	1.82 ± 0.06	1.91 ± 0.04
Limfocytes, %	28.54 ± 0.78	28.91 ± 1.01	30.86 ± 0.62
Eosinophils, 10 ⁹ /L	0.40 ± 0.04 **	0.33 ± 0.06 **	0.06 ± 0.01
Eosimophils, %	5.65 ± 0.51 **	5.48 ± 0.49 **	1.09 ± 0.15
Neutrophils × 10 ⁹ /L	3.85 ± 0.13	3.76 ± 0.15	3.84 ± 0.12
Neutrophils, %	58.83 ± 1.01	57.97 ± 1.63	60.85 ± 0.80
Basophils × 10 ⁹ /L	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Basophils, %	0.45 ± 0.07	0.55 ± 0.12	0.27 ± 0.08
Monocytes × 10 ⁹ /L	0.59 ± 0.08	0.49 ± 0.02	0.45 ± 0.01
Monocytes, %	11.81 ± 3.12	7.52 ± 0.33	6.85 ± 0.34

Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM) and number of cases (n), unless otherwise stated. *p < 0.05; **p < 0.001 for comparisons between atopic and control groups. [†]p < 0.05 for comparisons between atopic dermatitis and allergic asthma groups.

Vitamin D levels in relation to the atopy

The distribution of vitamin D levels, categorized as deficiency (< 20 ng/mL), insufficiency (20–30 ng/mL), and normal levels (≥ 30–50 ng/mL), was asses-

sed across the study groups following vitamin D level testing (Fig. 1). Vitamin D deficiency was observed more frequently in the allergic asthma group compared to healthy subjects, and was less common in the atopic dermatitis group compared to the allergic asthma group. No significant differences in vitamin D deficiency were found between the atopic dermatitis and control groups. However, vitamin D deficiency was more prevalent in the combined atopic disease group (atopic dermatitis and allergic asthma) compared to the control group (46.6 % vs. 38.3 %, $p < 0.001$). Additionally, normal vitamin D levels were significantly less common in the allergic asthma group compared to the control group.

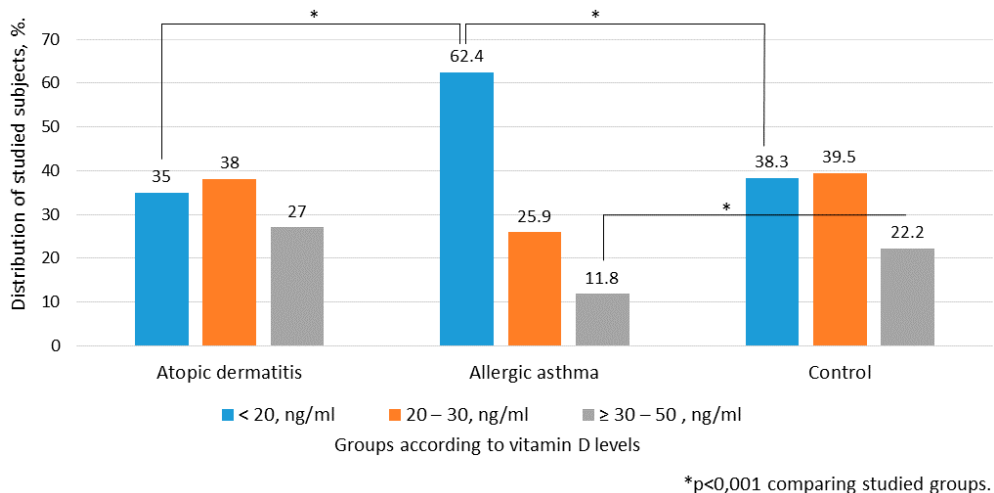


Fig. 1. Distribution of vitamin D levels by category: deficiency (< 20 ng/mL), insufficiency (20–30 ng/mL), and normal (≥ 30 –50 ng/mL) across studied groups.

Distribution of vitamin D receptor and vitamin D-binding protein gene polymorphisms

When evaluating the associations of *VDR* and *GC* gene SNPs with atopy, subjects were divided into atopic ($n = 185$) and control ($n = 81$) groups. The atopic group included individuals with AD and AA. No differences in the distribution of *VDR* SNPs were observed between the studied groups (Table 2). The *GC* SNP rs4588 genotype TT was found more frequently in the atopic group compared to the control. The prevalence of the rs4588 genotype TT was higher in atopy compared to control. The distribution of other identified *GC* SNPs did not differ between the groups.

Table 2. Distribution of vitamin D receptor and vitamin D-binding protein gene polymorphisms in atopy (n = 185) and control (n = 81) groups

Gene	SNP	Group	Genotype frequency, %			MAF
			AA	AG	GG	
VDR	rs731236 (TaqI) A>G		AA	AG	GG	G
		Atopy	33.1	55.2	11.6	39.2
		Control	26.0	62.3	11.7	42.8
	rs7975232 (ApaI) A>C		AA	AC	CC	C
		Atopy	26.5	48.6	24.9	49.2
		Control	25.9	46.9	27.2	49.4
	rs1544410 (BsmI) C>T		CC	TC	TT	T
		Atopy	42.2	45.9	11.9	34.9
		Control	39.2	48.1	12.7	36.7
	rs2228570 (FokI) G>A		GG	GA	AA	A
		Atopy	31.4	50.3	18.4	43.4
		Control	27.2	53.1	19.8	46.2
	rs3847987 C>A		CC	CA	AA	A
		Atopy	61.1	36.2	2.7	20.8
		Control	55.6	43.2	1.2	22.6
	rs11168293 G>T		GG	GT	TT	T
		Atopy	42.7	40.5	16.8	37.1
		Control	42.0	43.2	14.8	36.4
GC	rs4588 (Thr420Lys) G>T		GG	GT	TT	T
		Atopy	52.7	33.5	13.7*	30.5
		Control	53.2	43.0	3.8	25.3
	rs7041(Asp432Glu) C>A		CC	AC	AA	A
		Atopy	35.0	48.3	16.7	40.9
		Control	31.3	58.8	10.0	39.4
	rs4725 (Cys299Cys) G>A		GG	GA	AA	A
		Atopy	45.0	49.7	5.3	30.2
		Control	38.2	59.2	2.6	32.2
	rs3733359 G>A		GG	GA	AA	A
		Atopy	95.1	4.4	0.5	2.7
		Control	93.7	6.3	0	1.1

VDR – vitamin D receptor gene, GC – vitamin D-binding protein gene, SNP – single nucleotide polymorphism, MAF – minor allele frequency. *p < 0.05 compared with control.

Vitamin D receptor and vitamin D-binding protein gene polymorphisms and vitamin D

The distribution of VDR SNPs in the atopy and control groups according to vitamin D levels, categorized as vitamin D deficiency (≤ 30 ng/mL) and

normal levels (> 30 ng/mL), is presented in Table 3. Evaluating the results in the control group, it was found that the distribution of the rs3847987 genotype CC and the rs3847987 genotype AC was significantly more frequent in the control group of subjects with reduced vitamin D levels than in those with normal vitamin D levels. No significant VDR gene VNP distribution was found in the atopic disease group.

Significant associations between gene polymorphisms and normal vitamin D levels were determined using logistic regression analysis and are provided in Table 4. Furthermore, *VDR* SNP rs3847987 genotypes AA and AC, as well as the A allele were found to have protective effects against reduced vitamin D levels in control group. In the control group, a significant association was found between the *VDR* SNP rs731236 GG genotype and normal vitamin D levels, as well as between rs2228570 allele A and reduced vitamin D levels. It is important to note that significant relationship was found in atopic group between the *VDR* SNP rs11168293 genotype GG and reduced vitamin D levels.

Table 3. Vitamin D receptor gene polymorphisms distribution in atopic disease patients (n = 185) and control groups (n = 81) according to serum vitamin D levels

Gene	SNP	Vitamin D, ng/mL	Genotype frequency n, %		
VDR	rs731236 (TaqI) A>G	Atopy	GG	AG	AA
		≤30	51 (34.4)	79 (54.9)	14 (9.7)
		>30	9 (24.3)	21 (56.8)	7 (18.9)
		Control			
		≤30	7 (9.5)	37 (57.1)	18 (27.0)
		>30	3 (16.7)	12 (66.7)	3 (16.7)
	rs7975232 (ApaI) A>C	Atopy	AA	AC	CC
		≤30	38 (25.7)	72 (48.6)	38 (25.7)
		>30	11 (29.7)	18 (48.6)	8 (21.6)
		Control			
		≤30	16 (25.4)	28 (44.4)	19 (30.2)
		>30	5 (27.8)	10 (55.6)	3 (16.7)
	rs1544410 (BsmI) C>T	Atopy	CC	CT	TT
		≤30	63 (42.6)	70 (47.3)	15 (10.1)
		>30	15 (40.5)	15 (40.5)	7 (18.9)
		Control			
		≤30	24 (38.1)	31 (49.2)	6 (9.5)
		>30	7 (38.9)	7 (38.9)	4 (22.2)
	rs2228570 (FokI) G>A	Atopy	GG	AG	AA
		≤30	44 (29.7)	76 (51.4)	28 (18.9)
		>30	14 (37.8)	17 (45.9)	6 (12.2)
		Control			
		≤30	19 (30.2)	35 (55.6)	9 (14.3)
		>30	3 (16.7)	8 (44.4)	7 (38.9)
rs3847987 C>A	Atopy	CC	AC	AA	
	≤30	91 (61.5)	53 (35.8)	4 (2.7)	
	>30	22 (59.5)	14 (37.8)	1 (2.7)	
	Control				
	≤30	40 (63.5)*	22 (34.9)*	1 (1.6)	
	>30	5 (27.8)	13 (72.2)	0 (0)	
rs11168293 G>T	Atopy	GG	GT	TT	
	≤30	58 (39.2)	65 (43.9)	20 (16.2)	
	>30	21 (56.8)	10 (27.0)	6 (23.5)	
	Control				
	≤30	27 (42.9)	25 (39.7)	11 (17.5)	
	>30	7 (38.9)	10 (55.6)	1 (5.6)	

VDR – vitamin D receptor gene, SNP – single nucleotide polymorphism. * < 0.05 compared to the group with normal vitamin D levels (> 30 ng/mL).

Table 4. Associations of vitamin D receptor gene polymorphisms with vitamin D deficiency (<30 ng/mL) in atopic and control groups

	VDR SNP	Genotype and allelic model	Group	OR	95% CI	p-value
Vitamin D level: >30 ng/mL vs <30 ng/mL	rs731236 (TaqI) A>G	GG vs AA	Atopy	1.683	0.947–2.993	NS
			Control	4.037	1.117–14.588	0.033*
		AG vs AA	Atopy	1.889	0.470–7.587	NS
			Control	2.182	0.957–4.976	NS
		G carrier vs G non-carrier	Atopy	1.706	0.748–3.893	NS
			Control	2.024	0.519–7.898	NS
		A carrier vs A non-carrier	Atopy	0.462	0.171–1.243	NS
			Control	1.350	0.318–5.726	NS
		CC vs AA	Atopy	0.853	0.513–1.417	NS
			Control	0.784	0.415–1.480	NS
		AC vs AA	Atopy	1.143	0.332–3.937	NS
			Control	2.399	0.820–7.019	NS
		A carrier vs A non-carrier	Atopy	1.252	0.527–2.975	NS
			Control	2.159	0.559–8.340	NS
		C carrier vs C non-carrier	Atopy	0.817	0.369–1.809	NS
			Control	0.885	0.273–2.872	NS
		TT vs CC	Atopy	1.400	0.824–2.378	NS
			Control	1.907	0.923–3.944	NS
		CT vs CC	Atopy	0.774	0.239–2.508	NS
			Control	2.209	0.866–5.635	NS
	C carrier vs C non-carrier	Atopy	0.483	0.181–1.289	NS	
		Control	0.382	0.095–1.540	NS	
	T carrier vs T non-carrier	Atopy	1.087	0.522–2.262	NS	
		Control	1.062	0.362–3.111	NS	

Table 4 cont.

	VDR SNP	Genotype and allelic model	Group	OR	95% CI	p-value
Vitamin D level: <30 ng/mL vs >30 ng/mL	rs2228570 (FokI) G>A	AA vs GG	Atopy	0.821	0.481–1.399	NS
			Control	2.092	1.044–4.194	0.037*
		AG vs GG	Atopy	1.448	0.343–6.108	NS
			Control	7.137	2.025–25.145	0.002*
		G carrier vs G non-carrier	Atopy	0.695	0.328–1.475	NS
			Control	2.159	0.559–8.340	NS
	A carrier vs A non-carrier	Atopy	Control	1.206	0.459–3.168	NS
			Control	0.229	0.069–0.761	0.016*
		AA vs CC	Atopy	1.017	0.332–3.117	NS
			Control	35.997	6.401–202.446	<0.001*
	rs3847987 C>A	AC vs CC	Atopy	1.093	0.516–2.315	NS
			Control	4.727	1.489–15.007	0.008*
C carrier vs C non-carrier		Atopy	1.000	0.108–9.221	NS	
		Control	1.253	0.286–2.264	NS	
A carrier vs A non-carrier		Atopy	1.089	0.522–2.270	NS	
		Control	4.522	1.429–14.308	0.010*	
rs11168293 G>T	TT vs GG	Atopy	1.509	0.543–4.189	NS	
		Control	1.138	0.578–2.243	NS	
	GT vs GG	Atopy	0.425	0.185–0.977	0.044*	
		Control	1.969	0.696–5.525	NS	
rs11168293 G>T	G carrier vs G non-carrier	Atopy	1.050	0.396–2.782	NS	
		Control	3.596	0.432–29.933	NS	
	T carrier vs T non-carrier	Atopy	0.491	0.237–1.018	NS	
		Control	1.179	0.404–3.439	NS	

SNP – single nucleotide polymorphism. OR – odds ratio, 95% CI – confidence interval, NS – not statistically significant, *p < 0.05.

After assessing the distribution of GC gene SNPs in the studied groups with regard to vitamin D levels, a higher frequency of the rs4588 GG genotype and a lower frequency of the GT genotype were found in the atopy group with normal vitamin D levels compared to cases with reduced vitamin D levels (Table 5). No significant distribution differences for other polymorphisms were found between the groups.

Using a logistic regression analysis model, associations between GC polymorphisms and vitamin D deficiency were evaluated in the atopy and control groups (Table 6). A significant association was identified between the rs4588 T allele and reduced vitamin D levels during atopy.

Table 5. vitamin D-binding protein gene polymorphisms distribution in atopic patients (n = 185) and control groups (n = 81) according to serum vitamin D levels

Gene	SNP	Vitamin D, ng/mL	Genotype frequency n, %		
			GG	GT	TT
GC	rs4588 (Thr420Lys) G>T	Atopy	GG	GT	TT
		≤30	71 (49.0)*	54 (37.2)*	20 (13.8)
		>30	25 (67.6)	7 (18.9)	5 (13.5)
		Control			
		≤30	13 (72.2)	5 (27.8)	0 (0)
		>30	29 (47.5)	29 (47.5)	3 (4.9)
	rs7041(Asp432Glu) C>A	Atopy	CC	CA	AA
		≤30	25 (17.5)	70 (49.0)	48 (33.6)
		>30	5 (13.5)	12 (45.9)	15 (40.5)
		Control			
		≤30	8 (12.9)	35 (56.5)	19 (30.6)
		>30	0 (0)	12 (66.7)	6 (33.3)
	rs4725 (Cys299Cys) G>A	Atopy	GG	AG	AA
		≤30	60 (44.8)	68 (50.7)	6 (4.5)
		>30	17 (45.9)	17 (45.9)	3 (8.1)
		Control			
		≤30	22 (37.9)	34 (58.6)	2 (3.4)
		>30	7 (38.9)	11 (61.1)	0 (0)
	rs3733359 G>A	Atopy	GG	GA	AA
		≤30	138 (95.2)	6 (4.1)	1 (0.7)
>30		35 (94.6)	2 (5.4)	0 (0)	
Control					
≤30		57 (93.4)	4 (6.6)	0 (0)	
>30		17 (94.4)	1 (5.6)	0 (0)	

GC – vitamin D-binding protein gene, SNP – single nucleotid polymorphism. * < 0.05 compared to the group with normal vitamin D levels (> 30 ng/mL).

Table 6. Associations of vitamin D-binding protein gene polymorphisms with vitamin D deficiency (<30 ng/mL) in atopic and control groups

	GC SNP	Genotype and allelic model	Group	OR	95% CI	p-value	
Vitamin D level: <30 ng/mL vs >30 ng/mL	rs4588 (Thr-420Lys) G>T	GG vs TT	Atopy	0.843	0.491–1.447	NS	
			Control	0.711	0.323–1.565	NS	
		GT vs TT	Atopy	1.929	0.549–6.779	NS	
			Control	1.156	0.509–4.467	NS	
		G carrier vs G non-carrier	Atopy	1.024	0.357–2.938	NS	
			Control	1.093	0.740–5.877	NS	
		T carrier vs T non-carrier	Atopy	0.461	0.215–0.986	0.046*	
			Control	0.349	0.111–1.098	NS	
		rs7041 (Asp432Glu) C>A	CC vs AA	Atopy	1.438	0.846–2.444	NS
				Control	1.388	0.645–3.012	NS
	CA vs AA		Atopy	1.214	0.406–3.636	NS	
			Control	1.729	0.615–2.153	NS	
	A carrier vs A non-carrier		Atopy	0.741	0.353–1.557	NS	
			Control	0.884	0.289–2.705	NS	
	C carrier vs C non-carrier	Atopy	1.664	0.539–5.133	NS		
		Control	1.283	0.640–3.447	NS		
	rs4725 (Cys-299Cys) G>A	AA vs GG	Atopy	1.328	0.632–2.794	NS	
			Control	1.121	0.365–3.025	NS	
		AG vs GG	Atopy	0.882	0.414–1.880	NS	
			Control	1.017	0.342–3.021	NS	
		G carrier vs G non-carrier	Atopy	0.531	0.126–2.230	NS	
			Control	0.310	0.270–3.733	NS	
	A carrier vs A non-carrier	Atopy	0.954	0.459–1.981	NS		
		Control	1.048	0.356–3.038	NS		
	rs3733359 G>A	AA vs GG	Atopy	1.512	0.774–3.223	NS	
			Control	0.286	0.423–1.656	NS	
		AG vs GG	Atopy	1.314	0.254–6.794	NS	
			Control	0.838	0.088–8.011	NS	
G carrier vs G non-carrier		Atopy	0.255	0.362–3.371	NS		
		Control	0.286	0.432–3.748	NS		
A carrier vs A non-carrier	Atopy	1.127	0.224–5.662	NS			
	Control	0.838	0.088–8.011	NS			

GC – vitamin D-binding protein gene, SNP – single nucleotid polymorphism, OR – odds ratio, 95% CI – confidence interval, NS – not statistically significant, *p < 0.05.

Immune response

T lymphocyte subtypes and serum cytokines levels

The levels of T lymphocyte subtypes involved in inflammation activation (Th2, Th17) and inflammation suppression (Th1, Treg) in the study groups are presented in Table 7. Significantly higher levels of Th1, Th2, and Th17, along with lower levels of Treg lymphocytes, were found in the atopy group compared to the control group. The Th17/Treg ratio was lower in the atopy group. When evaluating the Th1/Th2 ratio, no significant differences were found between the groups; however, the ratio of these lymphocyte populations tended to be lower in the AD and AA groups compared to the control group.

Table 7. Levels of T lymphocytes and their ratios in the studied groups

T lymphocytes, % of PBMC	Atopic dermatitis n = 32	Allergic asthma n = 29	Control 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 ⁺ IL17-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/Th2 ratio	4.62 ± 0.68	4.88 ± 0.56	6.58 ± 0.66
Th17/Treg ratio	1.63 ± 0.33*	1.20 ± 0.13*	2.19 ± 0.31

PBMC – peripheral blood mononuclear cells. *p < 0.05 compared with control; **p < 0.001 compared with control.

The levels of pro-inflammatory (IL-5, IL-17A, IL-33) and anti-inflammatory (TGF- β 1, IL-10, IFN- γ , IL-35) cytokines in the study groups are presented in Table 8. The levels of pro-inflammatory cytokines IL-5 and IL-17A and the anti-inflammatory cytokine TGF- β 1 were significantly higher in the AD and AA groups than in the control group. In addition, the levels of IL-10 and were lower in the AD and AA groups than in the control group. No differences in cytokine levels were found between the AD and AA groups.

Table 8. Levels of pro-inflammatory (IL-5, IL-17A, IL-33) and anti-inflammatory (TGF- β 1, IL-10, IFN- γ , IL-35) cytokines in the studied groups

Serum cytokines	Atopic dermatitis n = 98	Allergic asthma n = 43	Control groupe n = 34
IL-5, pg/mL	110.8 ± 8.55**	104.1 ± 12.2**	46.9 ± 5.32
IL-17A, pg/mL	31.0 ± 2.81*	32.82 ± 5.56*	14.3 ± 1.34
TGF- β 1, 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

Table 8 cont.

Serum cytokines	Atopic dermatitis n = 36	Allergic asthma n = 29	Control groupe n = 21
IFN- γ , pg/mL	0.74 \pm 0.19	0.81 \pm 0.29	0.71 \pm 0.22
IL-35, pg/mL	13.26 \pm 1.56	15.18 \pm 3.51	11.12 \pm 0.44
IL-33, pg/ mL	103.15 \pm 31.21	81.76 \pm 16.20	36.21 \pm 10.64

*p < 0.05 compared with control; **p < 0.001 compared with control.

Associations between immune markers

The associations between vitamin D, total IgE, blood eosinophils, T lymphocyte subtypes and related cytokines in atopy are presented in Table 9. The results revealed a significant positive relationship between total IgE levels and Treg lymphocytes, and the levels of IL-5 and TGF- β 1 in the atopy group. Additionally, increased IgE levels were associated with higher blood eosinophil counts. A negative correlation was observed between blood eosinophil counts and Th1 lymphocytes and vitamin D levels during atopy. Conversely, eosinophil counts positively correlated with serum IL-5 levels in atopic diseases. Serum vitamin D levels were significantly negatively correlated with Th1, Th2, and Th17 lymphocyte counts, and IL-5 levels. A positive correlation was also found between vitamin D and IL-33 levels during atopy.

Table 9. Correlation between vitamin D, total IgE, blood eosinophils, T lymphocyte subtypes and related cytokines in atopy

	IgE, U/mL	Eosinophil count, $\times 10^9/L$	Vit. D, ng/mL
IgE, U/mL	–	0.31**	0.08
Eosinophil count, $\times 10^9/L$	0.31**	–	-0.18*
Vit. D, ng/mL	0.08	-0.18*	–
Th1, % of PBMC	-0.09	-0.25*	-0.25*
Th2, % of PBMC	0.04	-0.05	-0.29*
Th17, % of PBMC	-0.08	-0.20	-0.21*
Treg, % of PBMC	0.21*	0.12	-0.03
Th1/Th2 ratio	-0,01	-0,11	-0,14
T17/Treg ratio	-0.14	-0.20	-0.01
IL-5, pg/mL	0.29*	0.30*	-0.32*
IL-17A, pg/mL	0.02	-0.01	0.14
TGF- β 1, ng/mL	0.25*	0.05	-0.08
IL-10, pg/mL	-0.07	-0.11	0.04
IFN- γ , pg/ mL	-0.02	-0.07	0.01
IL-35, pg/mL	-0.09	-0.02	0.05
IL-33, pg/mL	0.06	-0.05	0.31*

PBMC – peripheral blood mononuclear cells. *p < 0.05 comparing atopic and control groups; **p < 0.001 comparing atopic and control groups.

Table 10 presents the significant correlations between Th1, Th2, Th17, and Treg lymphocytes and their associated cytokine levels in atopy. A positive correlation was found between the increasing number of Th2 lymphocytes during atopy and the levels of Th17, Th1 lymphocytes, and TGF- β 1 in the serum, as well as a negative correlation with the Th1/Th2 and Th17/Treg lymphocyte ratios. The number of Th1 lymphocytes was positively associated with Th2, Th17 levels, and the Th17/Treg lymphocyte ratio. In addition to associations with Th2 and Th1 lymphocytes, Th17 lymphocytes were also negatively associated with IL-10 levels. Although no significant relationship was found between Th17 and Treg lymphocytes, Treg was associated with the Th1/Th2, Treg/Th17 lymphocyte ratio and TGF- β 1 levels in the serum of patients with atopy. The results revealed significant associations between IL-17A and cytokines related to the functional activity of Treg lymphocytes. IL-17A positively correlated with TGF- β 1 and IL-35 and negatively with IL-10. Furthermore, IL-10 was negatively correlated with TGF- β 1. A positive correlation was found between IL-10 and the pro-inflammatory cytokine IL-33. Additionally, IL-33 was positively associated with the Th1/Th2 lymphocyte ratio and IL-17A but negatively correlated with IFN- γ .

Table 10. Correlation between *T* lymphocytes and related cytokines

	Th1, % of PBMC	Th2, % of PBMC	Th17, % of PBMC	Treg, % of PBMC	Th1/Th2 ratio	Th17/Treg ratio	IL-17A, pg/mL	TGF-β1, ng/mL	IL-10, pg/mL	IFN-γ, pg/mL	IL-35, pg/mL	IL-33, pg/mL
Th1, % of PBMC	–	0.87**	0.84**	0.04	-0.20	0.54**	0.08	0.16	-0.19	0.05	-0.09	-0.14
Th2, % of PBMC	0.87**	–	0.78**	-0.12	-0.42**	-0.45**	0.24	0.3**	-0.15	0.11	-0.01	-0.03
Th17, % of PBMC	0.84**	0.78**	–	-0.03	0.28*	-0.81**	0.08	0.17	-0.28*	0.07	-0.09	-0.14
Treg, % of PBMC	0.04	-0.12	-0.03	–	0.28*	0.51**	-0.22	0.26**	-0.13	0.07	-0.21	-0.15
Th1/Th2 ratio	-0.20	-0.42**	0.28*	0.28*	–	-0.14	0.20	-0.18	-0.19	-0.08	-0.15	-0.29*
Th17/Treg ratio	0.54**	-0.45**	-0.81**	0.51**	-0.14	–	-0.5	-0.18	0.12	0.11	-0.05	0.09
IL-17A, pg/mL	0.08	0.24	0.08	-0.22	-0.20	-0.5	–	0.48**	-0.53*	-0.7	0.4**	0.27*
TGF-β1, ng/mL	0.16	0.3**	0.17	0.26**	-0.18	-0.18	0.48**	–	-0.6**	-0.12	-0.05	-0.04
IL-10, pg/mL	-0.19	-0.15	-0.28*	-0.13	-0.19	0.12	-0.53*	-0.6**	–	-0.15	0.17	0.36**
IFN-γ, pg/mL	0.05	0.11	0.07	0.07	-0.08	0.11	-0.07	-0.17	-0.15	–	0.12	-0.37**
IL-35, pg/mL	-0.09	-0.01	-0.09	-0.21	-0.15	0.05	0.4**	-0.05	0.17	0.12	–	-0.06
IL-33, pg/mL	-0.14	-0.3	-0.14	-0.15	0.29*	0.9	0.27*	0.04	0.36**	-0.37**	-0.06	–

PBMC – peripheral blood mononuclear cells. *p < 0.05 comparing atopic and control groups; **p < 0.001 comparing atopic and control groups.

Vitamin D receptor and vitamin D-binding protein gene polymorphisms and immune response

Gene polymorphisms and total IgE and blood eosinophil levels during atopy

The results obtained showed a significant distribution of total IgE and blood eosinophil levels during atopy, taking into account different genotypes (Fig. 2) and alleles (Fig. 3).

The results demonstrated a significant relationship between the *GC* gene SNP rs7041 and eosinophil levels during atopy. Patients with atopy who had the rs7041 CC genotype showed significantly higher blood eosinophil counts than those with the AA genotype of this SNP (Fig. 2). When assessing the associations of the *GC* SNP rs7041 alleles with atopy markers, the results revealed that subjects who were carriers of the rs7041 C allele had higher blood eosinophil and total IgE levels than those who lacked the C allele (Fig. 3). Moreover, patients with atopy who had the rs4588 T allele were found to have higher blood eosinophil levels than those who did not have this allele (Fig. 3). Additionally, a trend was observed where individuals with the rs4588 TT genotype had higher eosinophil levels compared to those with other genotypes of this SNP (Fig. 2).

A significant distribution of total IgE and eosinophil levels was found during atopy concerning the rs11168293 genotypes and alleles of the *VDR* polymorphism. Patients with atopic diseases who had the rs11168293 T allele exhibited lower total IgE and blood eosinophil levels compared to those who did not have this allele (Fig. 3). Furthermore, the rs11168293 G allele was significantly associated with higher blood eosinophil levels during atopy. Additionally, there was a trend observed where patients with atopic diseases who had the rs11168293 GG genotype had higher eosinophil levels than those with the GT or TT genotypes (Fig. 2).

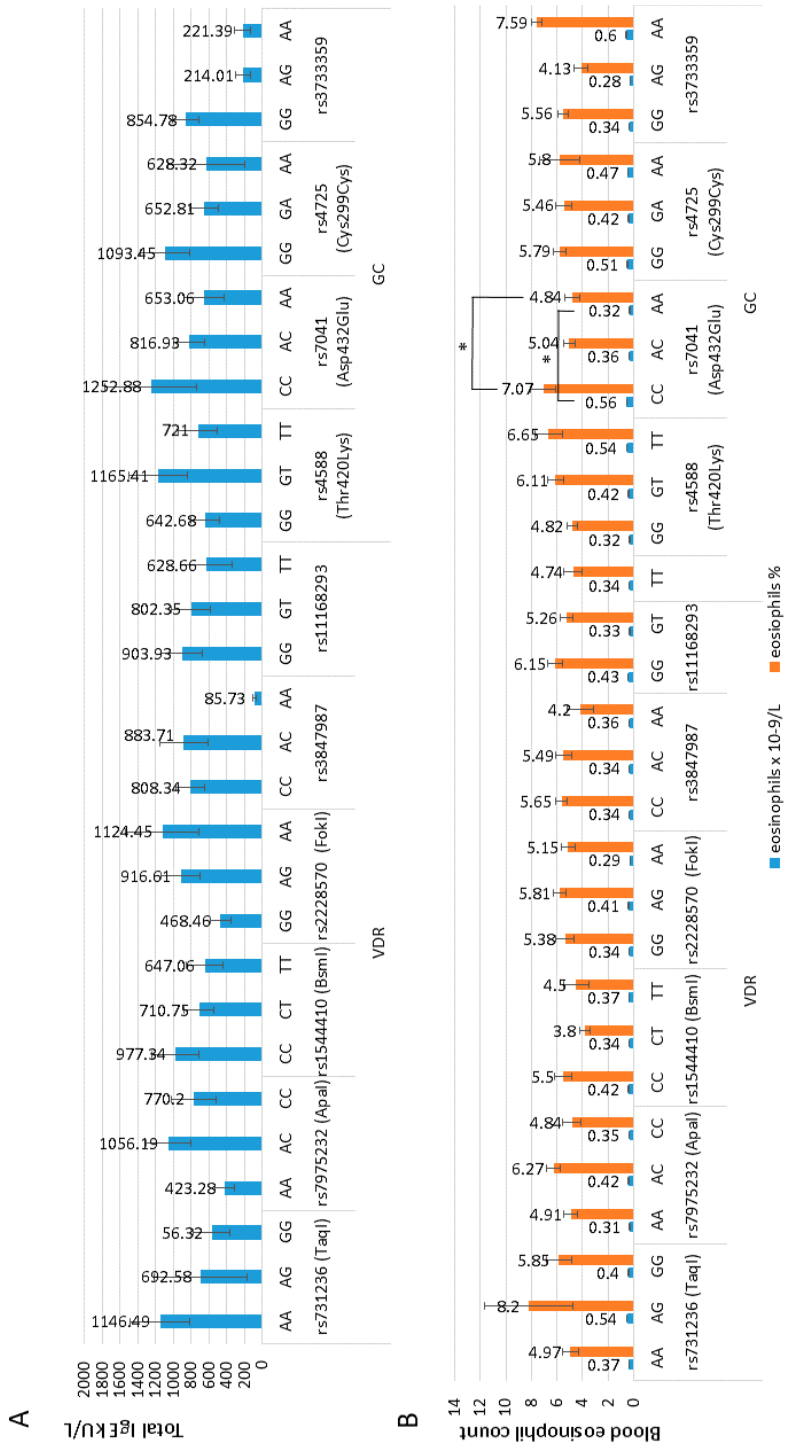


Fig. 2. Total IgE (A), blood eosinophil count (B) distribution according to vitamin D receptor and vitamin D-binding protein gene polymorphisms genotype in atopy (n = 185).

VDR – vitamin D receptor gene, GC – vitamin D binding protein gene. Data are presented as means.

*p < 0.05 when comparing genotypes of VDR or GC gene polymorphisms.

T lymphocyte and related cytokines distribution according to *VDR* gene polymorphisms in atopy

Associations between *VDR* gene SNPs and T lymphocyte subtypes in the atopy group are shown in Fig. 4. The results revealed that carriers of the *VDR* gene polymorphism rs731236 genotype AA had significantly higher levels of pro-inflammatory T lymphocyte helper populations Th2, Th17 and a higher Th1/Th2 ratio than those with the AG and GG genotypes of this polymorphism.

Associations between *VDR* gene SNPs and cytokines levels, including pro-inflammatory cytokines (IL-5, IL-17A, IL-33) and anti-inflammatory cytokines (TGF- β 1, IL-10, IFN- γ , IL-35), in atopy are shown in Fig. 5. Significant associations were found between the *VDR* SNP rs731236 genotype GG and lower IL-10 levels in atopy compared to other rs731236 genotypes. Furthermore, the AA genotype of the *VDR* SNP rs731236 was associated with lower TGF- β 1 levels in atopy compared to the AG genotype. Additionally, the rs11168293 genotype TT was associated with higher levels of IL-10 in atopy compared to other genotypes of this *VDR* SNP .

Associations between *GC* gene SNPs and T lymphocyte subtypes in the atopy group are shown in Fig. 6. The results of the study showed that different genotypes of rs4588 and rs7041 were associated with significant differences in T lymphocyte subtypes during atopy. In the atopy group, the *GC* SNP rs4588 genotype GG was associated with lower Th2 lymphocyte counts compared to the rs4588 GT genotype. Furthermore, the *GC* SNP rs4588 genotype GG was significantly associated with lower Th17 lymphocyte counts compared with the rs4588 TT genotype. The *GC* SNP rs7041 genotype CC was significantly associated with higher Th2 and Th17 lymphocyte counts in atopy compared to other genotypes of this polymorphism.

Associations between *GC* gene SNPs and cytokines levels, including pro-inflammatory cytokines (IL-5, IL-17A, IL-33) and anti-inflammatory cytokines (TGF- β 1, IL-10, IFN- γ , IL-35), in atopy are shown in Fig. 7. The results of the study showed that the rs4588 TT genotype detected in atopy was associated with lower TGF- β 1 levels compared to the GT genotype of this SNP. In patients with atopic diseases, the *GC* SNP rs7041 CC genotype was associated with lower TGF- β 1 and higher IL-10 levels compared to the rs7041 AA genotype. Furthermore, the *GC* SNP rs7041 CC genotype was associated with higher IL-35 levels than the AC genotype. The GG genotype of the *GC* SNP rs3733359 in atopy was associated with lower IL-10 levels compared to the GT genotype of this SNP.

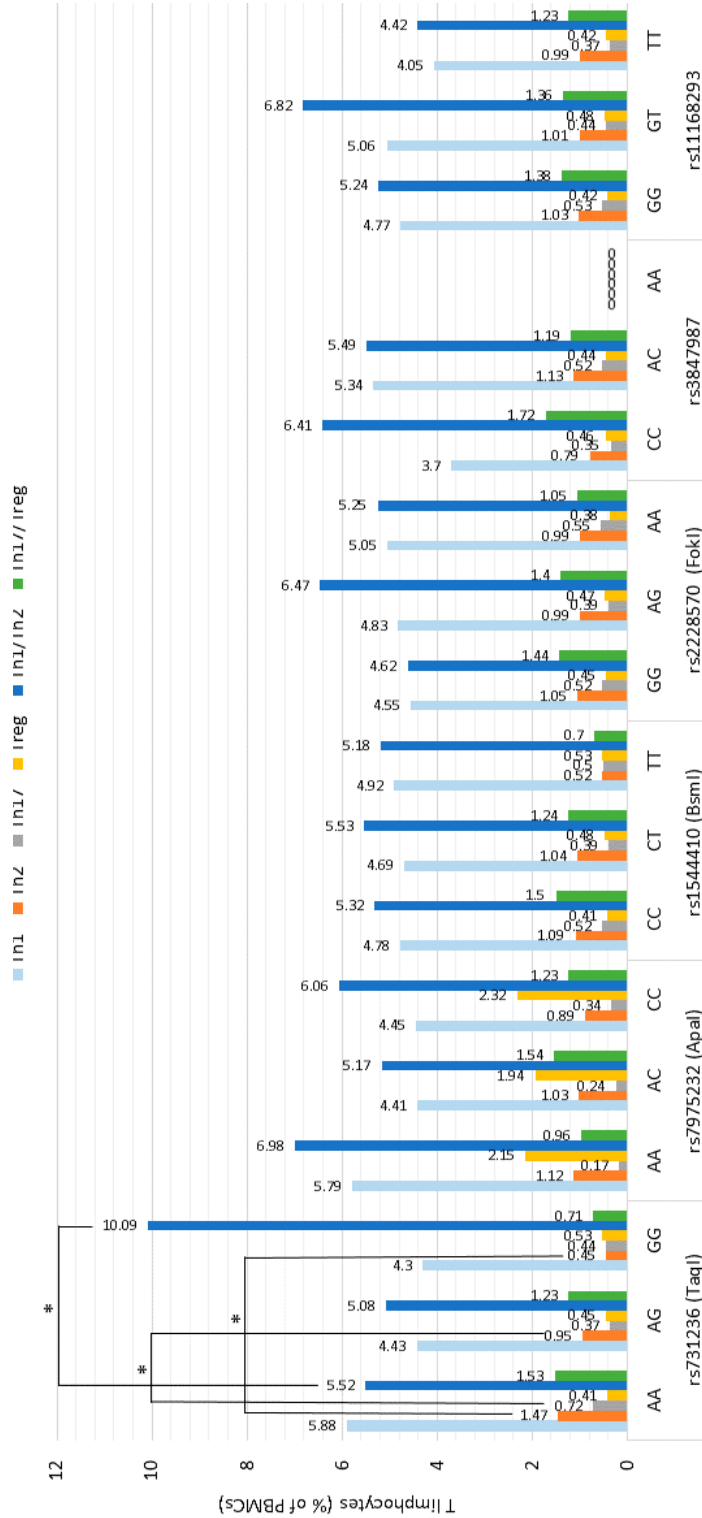


Fig. 4. T lymphocyte distribution according to vitamin D receptor gene polymorphisms in atopy (n = 61).

Data are presented as the mean, with lymphocyte populations expressed as a percentage of PBMCs. PBMCs – peripheral blood mononuclear cells, *p < 0.05 when comparing genotypes of vitamin D receptor gene polymorphisms.

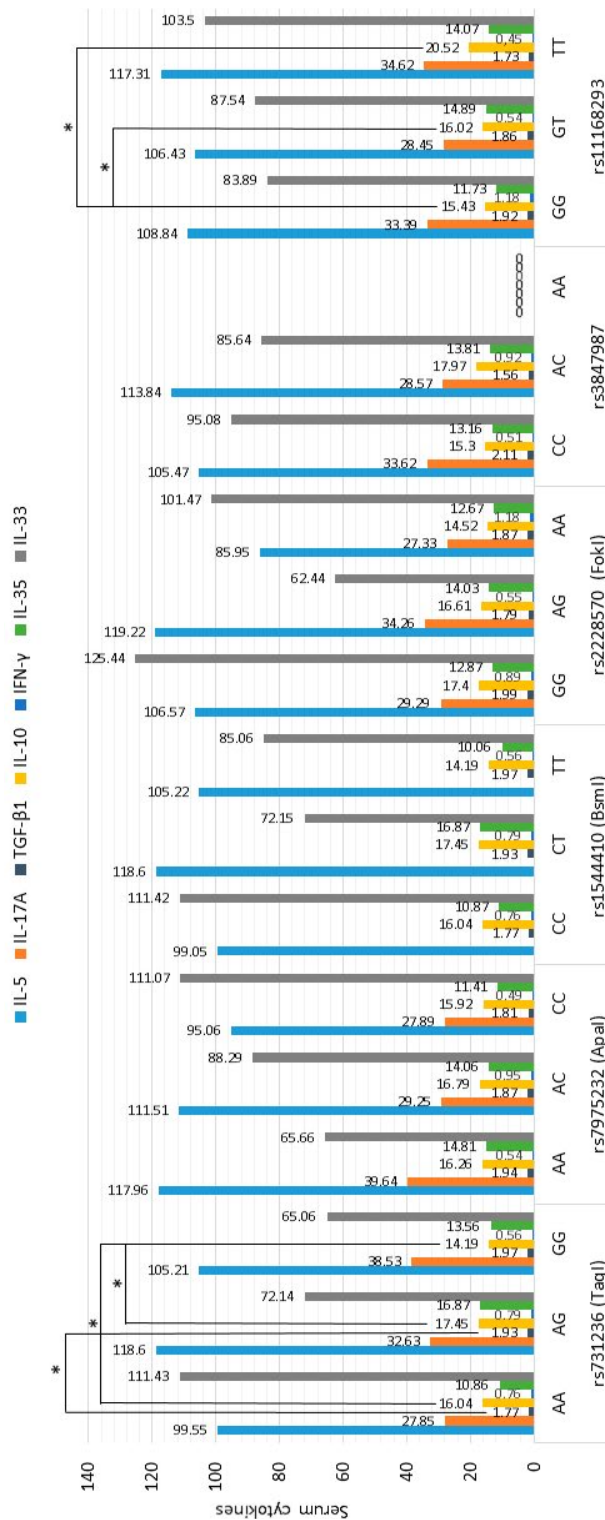


Fig. 5. Cytokines IL-5, IL-17A, TGF-β1, and IL-10 (n = 141) and IFN-γ, IL-35, IL-33 (n = 65) distribution according to vitamin D receptor gene polymorphisms in atopy.

Data are presented as mean serum cytokine levels, expressed as pg/mL for cytokines and ng/mL for TGF-β1. * p < 0.05 when comparing genotypes of vitamin D receptor gene polymorphisms.

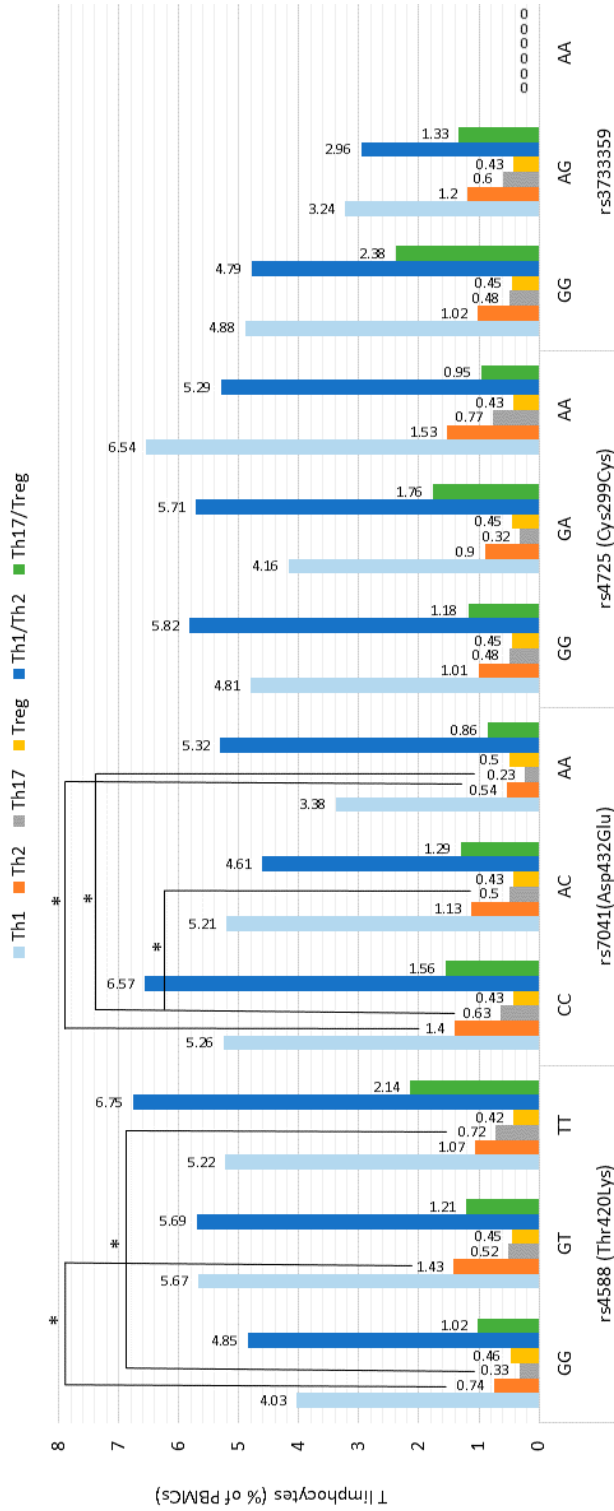


Fig. 6. T lymphocyte distribution according to vitamin D-binding protein gene polymorphisms in atopy (n = 61). Data are presented as the mean, with lymphocyte populations expressed as a percentage of PBMCs. PBMCs – peripheral blood mononuclear cells, *p < 0.05 when comparing genotypes of vitamin D-binding protein gene polymorphisms.

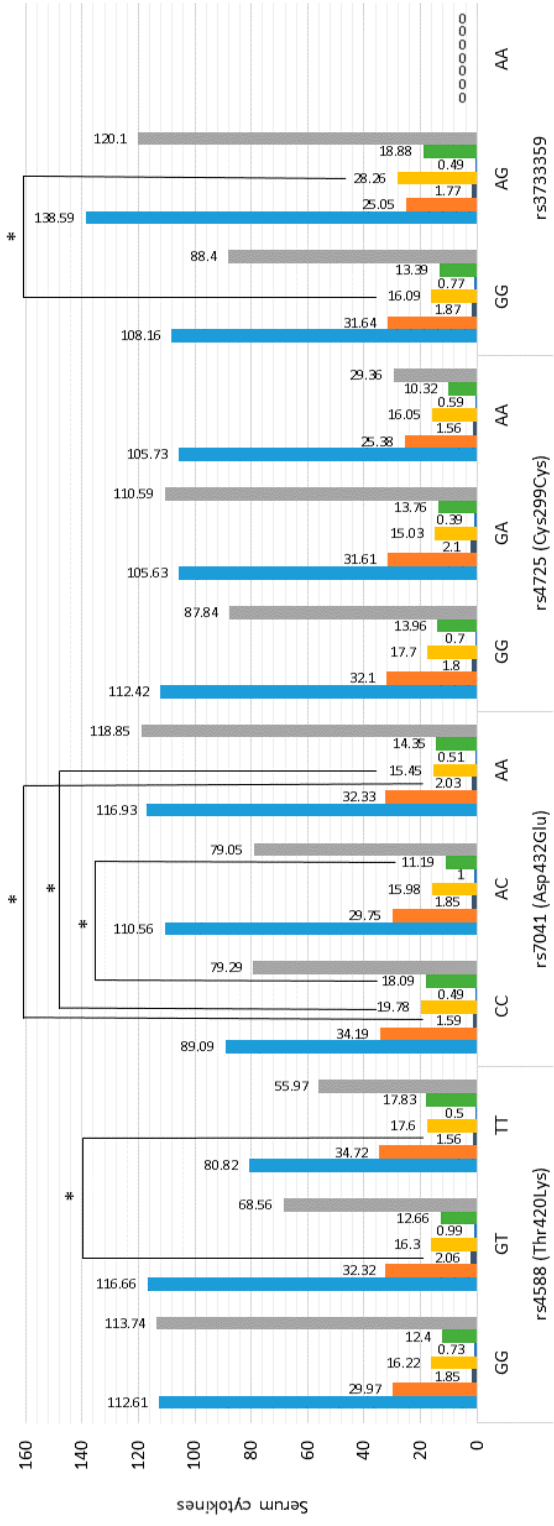


Fig. 7. Cytokines IL-5, IL-17A, TGF-β1, and IL-10 (n=141) and IFN-γ, IL-35, IL-33 (n = 65) distribution according to vitamin D-binding protein gene polymorphisms in atopy.

Data are presented as mean serum cytokine levels, expressed as pg/mL for cytokines and ng/mL for TGF-β1
 * p < 0.05 when comparing genotypes of vitamin D-binding protein gene polymorphisms.

CONCLUSIONS

1. Patients with atopic diseases (atopic dermatitis and allergic asthma) were found to have lower levels of vitamin D in their blood compared to the control group (healthy individuals).
2. Six polymorphisms of the vitamin D receptor gene and four polymorphisms of the vitamin D-binding protein gene were identified. The distribution of these polymorphisms did not differ significantly between the atopic and control groups. However, in the atopic group, a correlation was observed between decreased vitamin D levels and the rs11168293 GG genotype of the vitamin D receptor gene, as well as the rs4588 T allele of the vitamin D binding protein gene. In the control group, normal vitamin D levels were correlated with the rs3847987 AA, rs731236 GG, and rs2228570 GG genotypes.
3. A profile of immune response markers was identified in individuals with atopic diseases, showing significantly increased levels of total IgE, blood eosinophils, Th1, Th2, Th17, IL-5, IL-17A, TGF- β 1, and decreased levels of Treg and IL-10 in the blood. Additionally, vitamin D levels in atopic patients were inversely associated with inflammatory markers (Th2, Th17, IL-5, and eosinophil counts in the blood).
4. When examining immune marker levels in relation to specific gene variants, the following patterns emerged:
 - With the rs11168293 G allele of the vitamin D receptor gene or the rs4588 T and rs7041 C alleles of the vitamin D binding protein gene: increased levels of eosinophils and total IgE.
 - With the rs731236 AA genotype of the vitamin D receptor gene: increased levels of Th2 and Th17 lymphocytes. Conversely, in the rs731236 GG and rs11168293 GG genotypes, decreased IL-10 levels were observed.
 - With the rs4588 AA genotype of the vitamin D binding protein gene: increased Th2 and Th17 levels. In the rs7041 CC genotype, there were increased levels of Th2, Th17, IL-10, and IL-35, and decreased levels of TGF- β 1.

LIMITATIONS

The research results could have been influenced by some factors. Blood samples were collected only from September to April, a period when vitamin D levels naturally decline due to reduced sunlight exposure. However, many factors were not taken into account, such as individual sun exposure, seasonal fluctuations in vitamin D, diet, nutritional habits, body weight, and body mass index, all of which could have influenced the results. Additionally, the conduct of the study during the COVID-19 pandemic may have affected the results due to changes in participants' daily lives: social isolation, reduced physical activity, and potentially lower sun exposure. Furthermore, potential interactions with other genes involved in vitamin D metabolism, which could have additional effects, were not considered. The exclusion of these factors may limit the comprehensiveness of the conclusions. Therefore, it is essential for future studies to investigate these interactions to better understand the pathogenesis of atopic diseases and the influence of genetic and environmental factors. Moreover, atopic diseases are dynamic and can change over time, necessitating ongoing monitoring and deeper exploration of their etiology using a variety of research methods. Importantly, this study only includes the population of Lithuania. The unique genetic, environmental, and cultural characteristics of this population may influence the generalizability of the results and conclusions drawn. Additionally, there is limited data on similar studies in European populations, so the findings should be validated in research conducted in other populations with different genetic and environmental contexts.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

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):1153-1159.
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, Arikoğlu 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. Thiriou D, Morianos I, Xanthou G, Samitas K. Innate immunity as the orchestrator of allergic airway inflammation and resolution in asthma. *International Immunopharmacology*. 2017;48:43–54.
12. Zou X ling, Chen Z gui, Zhang T tuo, Feng D yun, Li H tao, Yang H ling. Th17/Treg homeostasis, but not Th1/Th2 homeostasis, is implicated in exacerbation of human bronchial asthma. *Ther Clin Risk Manag*. 2018;14:1627–36.
13. Boonpiyathad T, Sözener ZC, Akdis M, Akdis CA. The role of Treg cell subsets in allergic disease. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2020;38(3):139–49.
14. Zhang S, Gang X, Yang S, Cui M, Sun L, Li Z, et al. The Alterations in and the Role of the Th17/Treg Balance in Metabolic Diseases. *Front Immunol*. 2021 Jul 12;12:678355.
15. Domvri K, Porpodis K, Tzimagiorgis G, Chatzopoulou F, Kontaktiotis T, Kyriazis G, et al. Th2/Th17 cytokine profile in phenotyped Greek asthmatics and relationship to biomarkers of inflammation. *Respiratory Medicine*. 2019;151:102–10.
16. Ma JG, Wu GJ, Xiao HL, Xiao YM, Zha L. Vitamin D has an effect on airway inflammation and Th17/Treg balance in asthmatic mice. *Kaohsiung J Med Sci*. 2021;37(12):1113-1121
17. Daryabor G, Gholijani N, Kahmini FR. A review of the critical role of vitamin D axis on the immune system. *Exp Mol Pathol*. 2023;132-133:104866.

18. Li B, Zhang X, Sun Z, Xu B, Wu J, Liu H, Han H, Wang L, Wu W. A Novel Strategy for the Treatment of Allergic Rhinitis: Regulating Treg/Th17 and Th1/Th2 Balance In Vivo by Vitamin D. *Comput Math Methods Med.* 2022;2022:9249627.
19. Tibrewal C, Modi NS, Bajoria PS, Dave PA, Rohit RK, Patel P, Gandhi SK, Gutlapalli SD, Gottlieb P, Nfonoyim J. Therapeutic Potential of Vitamin D in Management of Asthma: A Literature Review. *Cureus.* 2023;15(7):e41956.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Ahmed AE, Hassan MH, Toghani 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):1349-1358.
24. 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.
25. 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.
26. Matucci A, Vultaggio A, Maggi E, Kasujee I. Is IgE or eosinophils the key player in allergic asthma pathogenesis? Are we asking the right question? *Respir Res.* 2018;19(1):113.
27. Bieber T. Interleukin-13: Targeting an underestimated cytokine in atopic dermatitis. *Allergy.* 2020;75(1):54–62.
28. Fyhrquist N, Werfel T, Bilò MB, Mülleneisen N, Gerth van Wijk R. The roadmap for the Allergyology speciality and allergy care in Europe and adjacent countries. An EAACI position paper. *Clinical and Translational Allergy.* 2019;9(1):3.
29. Avena-Woods C. Overview of atopic dermatitis. *Am J Manag Care.* 2017;23(8):115–23.
30. Augustin M, Misery L, von Kobyletzki L, Armario-Hita J c., Mealing S, Redding M. Unveiling the true costs and societal impacts of moderate-to-severe atopic dermatitis in Europe. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 2022;36(7):3-16.
31. Gashi V, Ahmetaj L. The Prevalence of Self-reported Respiratory Symptoms, Asthma and use of Asthma Medication Among Young Adolescents from Southeast Kosovo. *Med Arch.* 2020;74(1):19–23.
32. Asher MI, Ellwood P. The Global Asthma Report. 2014:2014
33. Caminati M, Vaia R, Furci F, Guarnieri G, Senna G. Unmet Needs in the Management of Patients. *Journal of Asthma and Allergy.* 2021;14:457.
34. Gurram RK, Zhu J. Orchestration between ILC2s and Th2 cells in shaping type 2 immune responses. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(3):225–35.
35. Wang J, Zhou Y, Zhang H, Hu L, Liu J, Wang L, Wang T, Zhang H, Cong L, Wang Q. Pathogenesis of allergic diseases and implications for therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):138.
36. Kapur S, Watson W, Carr S. Atopic dermatitis. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018;14(2):52.
37. Frazier W, Bhardwaj N. Atopic Dermatitis: Diagnosis and Treatment. *afp.* 2020;101(10):590–8.

38. Yang L, Fu J, Zhou Y. Research Progress in Atopic March. *Front Immunol.* 2020;11:1907.
39. Bantz SK, Zhu Z, Zheng T. The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma. *J Clin Cell Immunol.* 2014;5(2):202.
40. Zheng T, Yu J, Oh MH, Zhu Z. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011;3(2):67–73.
41. Liu L, Song G, Song Z. Intrinsic Atopic Dermatitis and Extrinsic Atopic Dermatitis: Similarities and Differences. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2022;15:2621-2628.
42. Lugović-Mihić L, Meštrović-Štefekov J, Potočnjak I, Cindrić T, Ilić I, Lovrić I, et al. Atopic Dermatitis: Disease Features, Therapeutic Options, and a Multidisciplinary Approach. *Life (Basel).* 2023;13(6):1419.
43. Tanei R, Hasegawa Y. Immunological Pathomechanisms of Spongiotic Dermatitis in Skin Lesions of Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12):6682.
44. Bieber T, Paller AS, Kabashima K, Feely M, Rueda MJ, Ross Terres JA, et al. Atopic dermatitis: pathomechanisms and lessons learned from novel systemic therapeutic options. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2022; 36(9): 0926-9959.
45. Guttman-Yassky E, Krueger JG. Atopic dermatitis and psoriasis: two different immune diseases or one spectrum? *Curr Opin Immunol.* 2017;48:68–73.
46. Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(4):845-52.
47. Ebina-Shibuya R, Leonard WJ. Role of thymic stromal lymphopoietin in allergy and beyond. *Nat Rev Immunol.* 2023;23(1):24–37.
48. Furue M, Chiba T, Tsuji G, Ulzii D, Kido-Nakahara M, Nakahara T, et al. Atopic dermatitis: immune deviation, barrier dysfunction, IgE autoreactivity and new therapies. *Allergy International.* 2017;66(3):398–403.
49. Kim J, Kim BE, Leung DYM. Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications. *Allergy Asthma Proc.* 2019;40(2):84-92.
50. Pan Y, Wang Y, Xu M, Zhong M, Peng X, Zeng K, Huang X. The Roles of Innate Immune Cells in Atopic Dermatitis. *J Innate Immun.* 2024;16(1):385-396
51. Froidure A, Mouthuy J, Durham SR, Chanez P, Sibille Y, Pilette C. Asthma phenotypes and IgE responses. *Eur Respir J.* 2016;47(1):304–19.
52. Habib N, Pasha MA, Tang DD. Current Understanding of Asthma Pathogenesis and Biomarkers. *Cells.* 2022;11(17):2764.
53. Kuruvilla ME, Lee FEH, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clinic Rev Allerg Immunol.* 2019;56(2):219–33.
54. Baos S, Calzada D, Cremades-Jimeno L, de Pedro M, Sastre J, Picado C, et al. Discriminatory Molecular Biomarkers of Allergic and Nonallergic Asthma and Its Severity. *Front Immunol.* 2019;10:1051.
55. Nappi E, Paoletti G, Malvezzi L, Ferri S, Racca F, Messina MR, et al. Comorbid allergic rhinitis and asthma: important clinical considerations. *Expert Rev Clin Immunol.* 2022;18(7):747-758.
56. Siddiqui ZA, Walker A, Pirwani MM, Tahiri M, Syed I. Allergic rhinitis: diagnosis and management. *Br J Hosp Med (Lond).* 2022;83(2):1-9.
57. Leynaert B, Neukirch C, Kony S, Guénégou A, Bousquet J, Aubier M, et al. Association between asthma and rhinitis according to atopic sensitization in a population-based study. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(1):86–93.
58. Radermecker C, Louis R, Bureau F, Marichal T. Role of neutrophils in allergic asthma. *Current Opinion in Immunology.* 2018;54:28–34.
59. Raji H, Haddadzadeh Shoushtari M, Idani E, Tavakol H, Afrakhteh S, Dastoorpoor M, et al. Forced Expiratory Flow at 25–75% as a Marker for Airway Hyper Responsiveness in Adult Patients with Asthma-like Symptoms. *Tanaffos.* 2018;17(2):90–5.

60. Seo HJ, Lee PH, Kim BG, Lee SH, Park JS, Lee J, et al. Methacholine bronchial provocation test in patients with asthma: serial measurements and clinical significance. *Korean J Intern Med.* 2018;33(4):807–14.
61. Butcher MJ, Zhu J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. *Fac Rev.* 2021;10:30.
62. Bretscher P. On Analyzing How the Th1/Th2 Phenotype of an Immune Response Is Determined: Classical Observations Must Not Be Ignored. *Front Immunol.* 2019;10:1234.
63. Zhu X, Wang X, Wang Y, Zhao Y. Exosomal long non-coding RNA GAS5 suppresses Th1 differentiation and promotes Th2 differentiation via downregulating EZH2 and T-bet in allergic rhinitis. *Mol Immunol.* 2020;118:30-39.
64. Scott G, Asrat S, Allinne J, Keat Lim W, Nagashima K, Birchard D, Srivatsan S, Ajithdoss DK, Oyejide A, Ben LH, Walls J, Le Floc'h A, Yancopoulos GD, Murphy AJ, Sleeman MA, Orengo JM. IL-4 and IL-13, not eosinophils, drive type 2 airway inflammation, remodeling and lung function decline. *Cytokine.* 2023;162:156091.
65. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science.* 2010;327(5969):1098–102.
66. Akdis CA, Arkwright PD, Brüggem MC, Busse W, Gadina M, Guttman-Yassky E, Kabashima K, Mitamura Y, Vian L, Wu J, Palomares O. Type 2 immunity in the skin and lungs. *Allergy.* 2020;75(7):1582-1605.
67. Shilovskiy IP, Kovchina VI, Timotievich ED, Nikolskii AA, Khaitov MR. Role and Molecular Mechanisms of Alternative Splicing of Th2-Cytokines IL-4 and IL-5 in Atopic Bronchial Asthma. *Biochemistry.* 2023;88(10):1608-1621.
68. Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(3):218–30.
69. Vercelli D, Jabara HH, Lauener RP, Geha RS. IL-4 inhibits the synthesis of IFN-gamma and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. *J Immunol.* 1990;144(2):570–3.
70. Brar K, Leung DY. Recent considerations in the use of recombinant interferon gamma for biological therapy of atopic dermatitis. *Expert Opin Biol Ther.* 2016;16(4):507-14.
71. Reinhold U, Kukel S, Brzoska J, Kreysel HW. Systemic interferon gamma treatment in severe atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 1993;29(1):58–63.
72. Sugaya M. The Role of Th17-Related Cytokines in Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1314.
73. Noval Rivas M, Chatila TA. Regulatory T cells in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(3):639–52.
74. Zhao Y, Liu Z, Qin L, Wang T, Bai O. Insights into the mechanisms of Th17 differentiation and the Yin-Yang of Th17 cells in human diseases. *Mol Immunol.* 2021;134:109-117.
75. Zhang S. The role of transforming growth factor β in T helper 17 differentiation. *Immunology.* 2018;155(1):24–35.
76. Fasching P, Stradner M, Graninger W, Dejaco C, Fessler J. Therapeutic Potential of Targeting the Th17/Treg Axis in Autoimmune Disorders. *Molecules.* 2017;22(1):134.
77. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible Pathogenic Role of Th17 Cells for Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2008;128(11):2625–30.
78. Looman KIM, Meel ER van, Grosserichter-Wagener C, Vissers FJM, Kligenberg JH, Jong NW de, et al. Associations of Th2, Th17, Treg cells, and IgA+ memory B cells with atopic disease in children: The Generation R Study. *Allergy.* 2020;75(1):178–87.
79. Sun X, Hou T, Cheung E, Iu TNT, Tam VWH, Chu IMT, et al. Anti-inflammatory mechanisms of the novel cytokine interleukin-38 in allergic asthma. *Cellular & Molecular Immunology.* 2020;17(6):631–46.

80. Klonowska J, Gleń J, Nowicki RJ, Trzeciak M. New Cytokines in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis—New Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):3086.
81. Nakajima S, Kitoh A, Egawa G, Natsuaki Y, Nakamizo S, Moniaga CS, et al. IL-17A as an inducer for Th2 immune responses in murine atopic dermatitis models. *J Invest Dermatol.* 2014;134(8):2122-2130.
82. Gu ZW, Wang YX, Cao ZW. Neutralization of interleukin-17 suppresses allergic rhinitis symptoms by downregulating Th2 and Th17 responses and upregulating the Treg response. *Oncotarget.* 2017;8(14):22361–9.
83. Mills KHG. IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. *Nat Rev Immunol.* 2023;23(1):38–54.
84. Hofmann MA, Fluhr JW, Ruwwe-Glösenkamp C, Stevanovic K, Bergmann KC, Zuberbier T. Role of IL-17 in atopy-A systematic review. *Clin Transl Allergy.* 2021;11(6):e12047.
85. Zhang YL, Han DH, Kim DY, Lee CH, Rhee CS. Role of Interleukin-17A on the Chemotactic Responses to CCL7 in a Murine Allergic Rhinitis Model. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169353.
86. Lee GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):730.
87. Zhang YY, Wang AX, Xu L, Shen N, Zhu J, Tu CX. Characteristics of peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells and related cytokines in severe atopic dermatitis. *European Journal of Dermatology.* 2016;26(3):240–6.
88. Boonpiyathad T, Satitsuksanoa P, Akdis M, Akdis CA. IL-10 producing T and B cells in allergy. *Seminars in Immunology.* 2019;44:101326.
89. Li Y, Xu W, Yao J, Cheng H, Sun X, Li L. Correlation of Blood FoxP3+ Regulatory T Cells and Disease Activity of Atopic Dermatitis. *J Immunol Res.* 2019;2019:1820182.
90. Abdel-Gadir A, Massoud AH, Chatila TA. Antigen-specific Treg cells in immunological tolerance: implications for allergic diseases. 2018;7:38.
91. Gu ZW, Wang YX, Cao ZW. Neutralization of interleukin-17 suppresses allergic rhinitis symptoms by downregulating Th2 and Th17 responses and upregulating the Treg response. *Oncotarget.* 2017;8(14):22361–9.
92. Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med.* 1982;156(6):1577–86.
93. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151–64.
94. Ono M. Control of regulatory T-cell differentiation and function by T-cell receptor signalling and Foxp3 transcription factor complexes. *Immunology.* 2020;160(1):24-37.
95. Zhang Z, Zhou X. Foxp3 Instability Helps tTregs Distinguish Self and Non-self. *Front Immunol.* 2019;10:2226.
96. Zhu X, Chen Q, Liu Z, Luo D, Li L, Zhong Y. Low expression and hypermethylation of FOXP3 in regulatory T cells are associated with asthma in children. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2020;19(3):2045–52.
97. Chen T, Hou X, Ni Y, Du W, Han H, Yu Y, et al. The Imbalance of FOXP3/GATA3 in Regulatory T Cells from the Peripheral Blood of Asthmatic Patients. *J Immunol Res.* 2018;2018:3096183.
98. Prince BT, Mikhail I, Stukus DR. Underuse of epinephrine for the treatment of anaphylaxis: missed opportunities. *J Asthma Allergy.* 2018;11:143–51.

99. Calzada D, Baos S, Cremades-Jimeno L, Cárđaba B. Immunological Mechanisms in Allergic Diseases and Allergen Tolerance: The Role of Treg Cells. *J Immunol Res.* 2018;2018:6012053.
100. Zong Y, Deng K, Chong WP. Regulation of Treg cells by cytokine signaling and co-stimulatory molecules. *Front Immunol.* 2024;15:1387975.
101. Shao Y, Yang WY, Saaoud F, Drummer C, Sun Y, Xu K, et al. IL-35 promotes CD4⁺Foxp3⁺ Tregs and inhibits atherosclerosis via maintaining CCR5-amplified Treg-suppressive mechanisms. *JCI Insight.* 2021;6(19):e152511.
102. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AKL, Flavell RA. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology.* 2006;24(1):99–146.
103. Wang J, Zhao X, Wan YY. Intricacies of TGF- β signaling in Treg and Th17 cell biology. *Cell Mol Immunol.* 2023;1–21.
104. Weissler KA, Frischmeyer-Guerrero PA. Genetic evidence for the role of transforming growth factor- β in atopic phenotypes. *Current Opinion in Immunology.* 2019;60:54–62.
105. Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy.* 2008;63(11):1455–63.
106. Ueda T, Niimi A, Matsumoto H, Takemura M, Yamaguchi M, Matsuoka H, et al. TGFB1 promoter polymorphism C-509T and pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(3):659–64.
107. Shafi T, Rasool R, Ayub S, Bhat IA, Shah IH, Hussain S, et al. Unveiling the *TGF- β 1* paradox: Significant implication of *TGF- β 1* promoter variants and its mRNA and protein expression in atopic dermatitis. *Molecular Immunology.* 2023;157:214–24.
108. Shafi T, Rasool Wani R, Hussain S, Bhat IA, Makhdoomi R, Bashir SA, et al. Investigating dysregulation of TGF- β 1/SMAD3 signaling in atopic dermatitis: a molecular and immunohistochemical analysis. *Clin Exp Immunol.* 2024;216(2):192–199.
109. Lommatzsch M, Schloetcke K, Klotz J, Schuhbaeck K, Zingler D, Zingler C, et al. Brain-derived Neurotrophic Factor in Platelets and Airflow Limitation in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(2):115–20.
110. Su LC, Liu XY, Huang AF, Xu WD. Emerging role of IL-35 in inflammatory autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2018;17(7):665–673.
111. Huang CH, Loo EXL, Kuo IC, Soh GH, Goh DLM, Lee BW, et al. Airway inflammation and IgE production induced by dust mite allergen-specific memory/effector Th2 cell line can be effectively attenuated by IL-35. *J Immunol.* 2011;187(1):462–71.
112. Shamji MH, Layhadi JA, Achkova D, Kouser L, Perera-Webb A, Couto-Francisco NC, et al. Role of IL-35 in sublingual allergen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2019;143(3):1131–1142.
113. Okada K, Fujimura T, Kikuchi T, Aino M, Kamiya Y, Izawa A, et al. Effect of interleukin (IL)-35 on IL-17 expression and production by human CD4⁺ T cells. *PeerJ.* 2017;5:e2999.
114. Yan A, Zhang Y, Wang X, Cui Y, Tan W. Interleukin 35 regulates interleukin 17 expression and T helper 17 in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Bioengineered.* 2022;13(5):13293–9.
115. Wang W, Li P, Chen Y fei, Yang J. A potential immunopathogenic role for reduced IL-35 expression in allergic asthma. *J Asthma.* 2015;52(8):763–71.
116. Suzuki M, Yokota M, Nakamura Y, Ozaki S, Murakami S. Intranasal administration of IL-35 inhibits allergic responses and symptoms in mice with allergic rhinitis. *Allergol Int.* 2017;66(2):351–6.
117. Agua-Doce A, Graca L. Regulatory T Cells and the Control of the Allergic Response. *Journal of Allergy.* 2012;2012:e948901.

118. Burton OT, Noval Rivas M, Zhou JS, Logsdon SL, Darling AR, Koleoglou KJ, et al. Immunoglobulin E signal inhibition during allergen ingestion leads to reversal of established food allergy and induction of regulatory T cells. *Immunity*. 2014;41(1):141–51.
119. Polukort SH, Rovatti J, Carlson L, Thompson C, Ser-Dolansky J, Kinney SR, et al. IL-10 Enhances IgE-Mediated Mast Cell Responses and Is Essential for the Development of Experimental Food Allergy in IL-10-Deficient Mice. *J Immunol*. 2016;196(12):4865–76.
120. Lee DJ, MG, Min, KY, Choi MY, Mi KY, Kime HS, et al. IL-10⁺ regulatory B cells mitigate atopic dermatitis by suppressing eosinophil activation. *Sci Rep*. 2024; 14:18164.
121. O’Garra A, Vieira P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(6):425–8.
122. Heaton T, Rowe J, Turner S, Aalberse RC, de Klerk N, Suriyaarachchi D, et al. An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet*. 2005;365(9454):142–9.
123. Melgaard ME, Jensen SK, Eliassen A, Pedersen CT, Thorsen J, Mikkelsen M, et al. Asthma development is associated with low mucosal IL-10 during viral infections in early life. *Allergy*. 2024;79(11):2981–2992.
124. John M, Lim S, Seybold J, Jose P, Robichaud A, O’Connor B, et al. Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1 α , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(1):256–62.
125. Coomes SM, Kannan Y, Pelly VS, Entwistle LJ, Guidi R, Perez-Lloret J, et al. CD4⁺ Th2 cells are directly regulated by IL-10 during allergic airway inflammation. *Mucosal Immunol*. 2017;10(1):150–161.
126. Li JD, Yin J. Interleukin-10-alveolar macrophage cell membrane-coated nanoparticles alleviate airway inflammation and regulate Th17/regulatory T cell balance in a mouse model. *Front Immunol*. 2023;14:1186393.
127. Justice JP, Shibata Y, Sur S, Mustafa J, Fan M, Van Scott MR. IL-10 gene knockout attenuates allergen-induced airway hyperresponsiveness in C57BL/6 mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(2):363–368.
128. Mäkelä MJ, Kanehiro A, Borish L, Dakhama A, Loader J, Joetham A, et al. IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(11):6007–12.
129. Ranjitkar S, Krajewski D, Garcia C, Tedeschi C, Polukort SH, Rovatti J, et al. IL-10 Differentially Promotes Mast Cell Responsiveness to IL-33, Resulting in Enhancement of Type 2 Inflammation and Suppression of Neutrophilia. *The Journal of Immunology*. 2024;212(9):1407–19.
130. Cayrol C, Girard JP. Interleukin-33 (IL-33): A critical review of its biology and the mechanisms involved in its release as a potent extracellular cytokine. *Cytokine*. 2022;156:155891.
131. Balato A, Raimondo A, Balato N, Ayala F, Lembo S. Interleukin-33: increasing role in dermatological conditions. *Arch Dermatol Res*. 2016;308(5):287–96.
132. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(1):43–64.
133. Di Salvo E, Casciaro M, Gangemi S. IL-33 genetics and epigenetics in immune-related diseases. *Clin Mol Allergy*. 2021;19(1):18.

134. Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard JP. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep.* 2008;9(10):1006–12.
135. Zhou Y, Xu Z, Liu Z. Role of IL-33-ST2 pathway in regulating inflammation: current evidence and future perspectives. *J Transl Med.* 2023;21(1):902.
136. Savinko T, Matikainen S, Saarialho-Kere U, Lehto M, Wang G, Lehtimäki S, et al. IL-33 and ST2 in Atopic Dermatitis: Expression Profiles and Modulation by Triggering Factors. *J Invest Dermatol.* 2012;132(5):1392–400.
137. Sundnes O, Pietka W, Loos T, Sponheim J, Rankin AL, Pflanz S, et al. Epidermal Expression and Regulation of Interleukin-33 during Homeostasis and Inflammation: Strong Species Differences. *J Invest Dermatol.* 2015;135(7):1771–80.
138. Meehansan J, Komine M, Tsuda H, Karakawa M, Tominaga S ichi, Ohtsuki M. Expression of IL-33 in the epidermis: The mechanism of induction by IL-17. *J Dermatol Sci.* 2013;71(2):107–14.
139. Chan BCL, Lam CWK, Tam LS, Wong CK. IL33: Roles in Allergic Inflammation and Therapeutic Perspectives. *Front Immunol.* 2019;10:364.
140. Imai Y, Yasuda K, Nagai M, Kusakabe M, Kubo M, Nakanishi K, et al. IL-33-Induced Atopic Dermatitis-Like Inflammation in Mice Is Mediated by Group 2 Innate Lymphoid Cells in Concert with Basophils. *J Invest Dermatol.* 2019;139(10):2185-2194.
141. Daryabor G, Gholijani N, Kahmini FR. A review of the critical role of vitamin D axis on the immune system. *Experimental and Molecular Pathology.* 2023;132–133:104866.
142. Bikle DD, Schwartz J. Vitamin D Binding Protein, Total and Free Vitamin D Levels in Different Physiological and Pathophysiological Conditions. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:317.
143. Bikle DD. Vitamin D: Newer Concepts of Its Metabolism and Function at the Basic and Clinical Level. *J Endocr Soc.* 2020;4(2):38.
144. Saponaro F, Saba A, Zucchi R. An Update on Vitamin D Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18):6573.
145. Blau JE, Collins MT. The PTH-Vitamin D-FGF23 axis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2015;16(2):165-74.
146. Awasthi R, Manger PT, Khare RK. Fok I and Bsm I gene polymorphism of vitamin D receptor and essential hypertension: a mechanistic link. *Clin Hypertens.* 2023;29(1):5.
147. Holick MF. Vitamin d status: measurement, interpretation and clinical application. *Ann Epidemiol.* 2009;19(2):73–8.
148. Jeffery LE, Wood AM, Qureshi OS, Hou TZ, Gardner D, Briggs Z, et al. Availability of 25-hydroxyvitamin D(3) to APCs controls the balance between regulatory and inflammatory T cell responses. *J Immunol.* 2012;189(11):5155–64.
149. R Janubová M, Žitňanová I. The effects of vitamin D on different types of cells. *Steroids.* 2024;202:109350.
150. Valcour A, Blocki F, Hawkins DM, Rao SD. Effects of age and serum 25-OH-vitamin D on serum parathyroid hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(11):3989–95.
151. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(4):1153–8.
152. Amrein K, Scherkl M, Hoffmann M, Neuwersch-Sommeregger S, Köstenberger M, Tmava Berisha A, et al. Vitamin D deficiency 2.0: an update on the current status worldwide. *Eur J Clin Nutr.* 2020;74(11):1498-1513.
153. Pludowski P, Karczmarewicz E, Bayer M, Carter G, Chlebna-Sokół D, Czech-Kowalska J, et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of

- deficits in Central Europe - recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. *Endokrynol Pol.* 2013;64(4):319–27.
154. Cui A, Zhang T, Xiao P, Fan Z, Wang H, Zhuang Y. Global and regional prevalence of vitamin D deficiency in population-based studies from 2000 to 2022: A pooled analysis of 7.9 million participants. *Front Nutr.* 2023;10:1070808
 155. Szymczak I, Pawliczak R. Can vitamin D help in achieving asthma control? Vitamin D “revisited”: an updated insight. *Adv Respir Med.* 2018;86(2):103–9.
 156. Chang SW, Lee HC. Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. *Pediatr Neonatol.* 2019;60(3):237–44.
 157. Martens PJ, Gysemans C, Verstuyf A, Mathieu C. Vitamin D’s Effect on Immune Function. *Nutrients.* 2020;12(5):1248.
 158. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in human leukocytes. *Science.* 1983;221(4616):1181–3.
 159. Carlberg C. Genomic signaling of vitamin D. *Steroids.* 2023;198:109271.
 160. El Abd A, Dasari H, Dodin P, Trottier H, Ducharme FM. Associations between vitamin D status and biomarkers linked with inflammation in patients with asthma: a systematic review and meta-analysis of interventional and observational studies. *Respir Res.* 2024;25(1):344.
 161. Penna G, Adorini L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol.* 2000;164(5):2405–11.
 162. Bscheider M, Butcher EC. Vitamin D immunoregulation through dendritic cells. *Immunology.* 2016;148(3):227–36.
 163. Ferreira GB, Vanherwegen AS, Eelen G, Gutiérrez ACF, Van Lommel L, Marchal K, et al. Vitamin D₃ Induces Tolerance in Human Dendritic Cells by Activation of Intracellular Metabolic Pathways. *Cell Rep.* 2015;10(5):711–725.
 164. Hafkamp FMJ, Taanman-Kueter EWM, van Capel TMM, Kormelink TG, de Jong EC. Vitamin D₃ Priming of Dendritic Cells Shifts Human Neutrophil-Dependent Th17 Cell Development to Regulatory T Cells. *Front Immunol.* 2022;13:872665.
 165. Jirapongsananuruk O, Melamed I, Leung DY. Additive immunosuppressive effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and corticosteroids on TH1, but not TH2, responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(5):981–5.
 166. Poon M, Craig ME, Kaur H, Cusumano J, Sasongko MB, Wong TY, et al. Vitamin D deficiency is not associated with changes in retinal geometric parameters in young people with type 1 diabetes. *J Diabetes Res.* 2013;2013:280691.
 167. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med.* 2002;195(5):603–16.
 168. Palmer MT, Lee YK, Maynard CL, Oliver JR, Bikle DD, Jetten AM, et al. Lineage-specific effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) on the development of effector CD4 T cells. *J Biol Chem.* 2011;286(2):997–1004.
 169. Valdés-López JF, Velilla P, Urcuqui-Inchima S. Vitamin D modulates the expression of Toll-like receptors and pro-inflammatory cytokines without affecting Chikungunya virus replication, in monocytes and macrophages. *Acta Trop.* 2022;232:106497.
 170. D’Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, Mazzeo D, Di Lucia P, Lang R, et al. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J Clin Invest.* 1998;101(1):252–62.

171. Giulietti A, van Etten E, Overbergh L, Stoffels K, Bouillon R, Mathieu C. Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;77(1):47–57.
172. Yip KH, Kolesnikoff N, Yu C, Hauschild N, Taing H, Biggs L, et al. Mechanisms of vitamin D3 metabolite repression of IgE-dependent mast cell activation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2014;133(5):1356-1364.
173. Souto Filho JTD, de Andrade AS, Ribeiro FM, Alves P de AS, Simonini VRF. Impact of vitamin D deficiency on increased blood eosinophil counts. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2018;11(1):25–9.
174. Carriero V, Bullone M, Bertolini F, Ricciardolo FLM. Vitamin D negatively correlates with blood eosinophilia in stable adult asthmatics. *European Respiratory Journal.* 2019;54:4305
175. Sharief S, Jariwala S, Kumar J, Muntner P, Melamed ML. Vitamin D levels and food and environmental allergies in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(5):1195–202.
176. Manousaki D, Paternoster L, Standl M, Moffatt MF, Farrall M, Bouzigon E, et al. Vitamin D levels and susceptibility to asthma, elevated immunoglobulin E levels, and atopic dermatitis: A Mendelian randomization study. *PLOS Medicine.* 2017;14(5):e1002294.
177. Guo H, Zheng Y, Cai X, Yang H, Zhang Y, Hao L, et al. Correlation between serum vitamin D status and immunological changes in children affected by gastrointestinal food allergy. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2018;46(1):39–44.
178. Farhan K, Alswailmi, Sikandar MZ, Shah SIA. Biological Roles of Vitamin D and Immunoglobulin E: Implications in Allergic Disorders. *Pakistan Journal of Medical and Health Sciences.* 2020;14:495–8.
179. Ethier C, Yu Y, Cameron L, Lacy P, Davoine F. Calcitriol Reduces Eosinophil Necrosis Which Leads to the Diminished Release of Cytotoxic Granules. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;171(2):119–29.
180. Brehm JM, Celedón JC, Soto-Quiros ME, Avila L, Hunninghake GM, Forno E, et al. Serum Vitamin D Levels and Markers of Severity of Childhood Asthma in Costa Rica. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(9):765–71.
181. Meral G, Uslu A, Yozgatli AU, Tuna HT, Yilmazbas NP, Akçay F, et al. The relationship between vitamin D, asthma and total IgE in children. *Studies on Ethno-Medicine.* 2017;11(1):91–7.
182. Safak AS, Bulut F. Comparison of Vitamin D Levels in Allergic Patients with and Without Asthma. *Bagcilar Med Bull.* 2019;4(4):93-98.
183. Mohamed WAW, Al-Shehri MA. Cord Blood 25-Hydroxyvitamin D Levels and the Risk of Acute Lower Respiratory Tract Infection in Early Childhood. *Journal of Tropical Pediatrics.* 2013;59(1):29–35.
184. Hall SC, Fischer KD, Agrawal DK. The impact of vitamin D on asthmatic human airway smooth muscle. *Expert Rev Respir Med.* 2016;10(2):127–35.
185. Nasiri-Kalmarzi R, Abdi M, Hosseini J, Tavana S, Mekarizadeh A, Rahbari R. Association of vitamin D genetic pathway with asthma susceptibility in the Kurdish population. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 2020;34(1):e23039.
186. Raby BA, Lazarus R, Silverman EK, Lake S, Lange C, Wjst M, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with childhood and adult asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(10):1057–65.
187. Hollams EM, Hart PH, Holt BJ, Serralha M, Parsons F, de Klerk NH, et al. Vitamin D and atopy and asthma phenotypes in children: a longitudinal cohort study. *Eur Respir J.* 2011;38(6):1320–7.

188. Searing DA, Zhang Y, Murphy JR, Hauk PJ, Goleva E, Leung DYM. Decreased serum vitamin D levels in children with asthma are associated with increased corticosteroid use. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(5):995–1000.
189. Mai XM, Chen Y, Camargo Jr. CA, Langhammer A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and self-reported allergic rhinitis in Norwegian adults – The HUNT Study. *Allergy*. 2014;69(4):488–93.
190. Benson AA, Toh JA, Vernon N, Jariwala SP. The role of vitamin D in the immunopathogenesis of allergic skin diseases. *Allergy*. 2012;67(3):296–301.
191. Rausch-Fan X, Leutmezer F, Willheim M, Spittler A, Bohle B, Ebner C, et al. Regulation of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells and allergen-specific th cell clones by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;128(1):33–41.
192. Hata TR, Kotal P, Jackson M, Nguyen M, Paik A, Udall D, et al. Administration of oral vitamin D induces cathelicidin production in atopic individuals. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(4):829–31.
193. Di Filippo P, Scaparrotta A, Rapino D, Cingolani A, Attanasi M, Petrosino MI, et al. Vitamin D supplementation modulates the immune system and improves atopic dermatitis in children. *Int Arch Allergy Immunol*. 2015;166(2):91–6.
194. El Taieb MA, Fayed HM, Aly SS, Ibrahim AK. Assessment of Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels in Children with Atopic Dermatitis. *Dermatitis*. 2013;24(6):296–301.
195. Peroni DG, Piacentini GL, Cametti E, Chinellato I, Boner AL. Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D levels and severity of atopic dermatitis in children. *British Journal of Dermatology*. 2011;164(5):1078–82.
196. Lee SA, Hong S, Kim HJ, Lee SH, Yum HY. Correlation Between Serum Vitamin D Level and the Severity of Atopic Dermatitis Associated With Food Sensitization. *Allergy, Asthma & Immunology Research*. 2013;5(4):207–10.
197. Lombardi C, Passalacqua G, Italian Vitamin D Allergy Group. Vitamin D levels and allergic diseases. An italian cross-sectional multicenter survey. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2017;49(2):75–9.
198. Dogru M. Is vitamin D level associated with the natural course of atopic dermatitis? *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2018;46(6):546–51.
199. Akan A, Azkur D, Ginis T, Toyran M, Kaya A, Vezir E, et al. Vitamin D Level in Children Is Correlated with Severity of Atopic Dermatitis but Only in Patients with Allergic Sensitizations. *Pediatric Dermatology*. 2013;30(3):359–63.
200. Samochocki Z, Bogaczewicz J, Jeziorkowska R, Sysa-Jędrzejowska A, Glińska O, Karczmarewicz E, et al. Vitamin D effects in atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2013;69(2):238–44.
201. Chiu YE, Havens PL, Siegel DH, Ali O, Wang T, Holland KE, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentration does not correlate with atopic dermatitis severity. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2013;69(1):40–6.
202. Thuesen BH, Heede NG, Tang L, Skaaby T, Thyssen JP, Friedrich N, et al. No association between vitamin D and atopy, asthma, lung function or atopic dermatitis: a prospective study in adults. *Allergy*. 2015;70(11):1501–4.
203. Kim G, Bae JH. Vitamin D and atopic dermatitis: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition*. 2016;32(9):913–20.
204. Li Q, Zhou Q, Zhang G, Tian X, Li Y, Wang Z, et al. Vitamin D Supplementation and Allergic Diseases during Childhood: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2022;14(19):3947.
205. El Abd A, Dasari H, Dodin P, Trottier H, Ducharme FM. The effects of vitamin D supplementation on inflammatory biomarkers in patients with asthma: a systematic

- review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Front Immunol.* 2024;15:1335968.
206. Barlianto W, Wulandari D, Sari TL, Firdayanti VH, Avandi MI. Vitamin D, cytokine profiles, and disease severity in infants with atopic dermatitis: a single centre, cross-sectional study. *Postepy Dermatol Alergol.* 2022;39(4):793–9.
 207. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science.* 1998;280(5366):1077–82.
 208. Malkki M, Petersdorf EW. Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms by 5' Nuclease Allelic Discrimination. *Methods Mol Biol.* 2012;882:173–82.
 209. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 2010;467(7319):1061–73.
 210. International HapMap 3 Consortium, Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Altshuler DM, Gibbs RA, et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature.* 2010;467(7311):52–8.
 211. Azzadeh-Roodpish S, Garzon MH, Mainali S. Classifying single nucleotide polymorphisms in humans. *Mol Genet Genomics.* 2021;296(5):1161–1173.
 212. Chanock S. Candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the study of human disease. *Dis Markers.* 2001;17(2):89–98.
 213. Marian AJ. Sequencing your genome: what does it mean? *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2014;10(1):3–6.
 214. Mohammad M, Alourfi Z, Haddad S. Relationship between vitamin D receptor gene *FokI* polymorphism and 25-hydroxyvitamin D levels in apparently healthy Syrians. *Meta Gene.* 2021;29:100945.
 215. Usategui-Martín R, De Luis-Román DA, Fernández-Gómez JM, Ruiz-Mambrilla M, Pérez-Castrillón JL. Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms Modify the Response to Vitamin D Supplementation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 2022;14(2):360.
 216. Hassan I, Bhat YJ, Majid S, Sajad P, Rasool F, Malik RA, et al. Association of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Serum 25-Hydroxy Vitamin D Levels in Vitiligo – A Case-control Study. *Indian Dermatol Online J.* 2019;10(2):131–8.
 217. Paramonova N, Trapina I, Gradauskiene (Sitkauskiene) B, Plavina S, Tamasauskiene L, Bastyte D, et al. Genetic Diversity in Bronchial Asthma Susceptibility: Exploring the Role of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Varied Geographic Contexts. *Int J Mol Sci.* 2024;25(3):1943.
 218. Khan AH, Jafri L, Siddiqui A, Naureen G, Morris H, Moatter T. Polymorphisms in the GC Gene for Vitamin D Binding Protein and Their Association with Vitamin D and Bone Mass in Young Adults. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2019;29(8):715–9.
 219. Yu S, Li X, Yu F, Mao Z, Wang Y, Xue Y, et al. New evidence for associations between vitamin D receptor polymorphism and obesity: case-control and family-based studies. *J Hum Genet.* 2020;65(3):281–5.
 220. Ou Y, Jiang X, Guan H. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Risk of Atopic Dermatitis in Chinese Han Population. *International Journal of General Medicine.* 2021;14:5301–12.
 221. James J, Weaver V, Cantorna MT. Control of Circulating IgE by the Vitamin D Receptor In Vivo Involves B Cell Intrinsic and Extrinsic Mechanisms. *J Immunol.* 2017;198(3):1164–71.
 222. Cantorna MT, Arora J. Two lineages of immune cells that differentially express the vitamin D receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2023;228:106253.

223. Arora J, Wang J, Weaver V, Zhang Y, Cantorna MT. Novel insight into the role of the vitamin D receptor in the development and function of the immune system. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2022;219:106084.
224. Castellano-Castillo D, Morcillo S, Clemente-Postigo M, Crujeiras AB, Fernandez-García JC, Torres E, et al. Adipose tissue inflammation and VDR expression and methylation in colorectal cancer. *Clinical Epigenetics.* 2018;10(1):60.
225. Agrawal T, Gupta GK, Agrawal DK. Vitamin D deficiency decreases the expression of VDR and prohibitin in the lungs of mice with allergic airway inflammation. *Exp Mol Pathol.* 2012;93(1):74–81.
226. Papadopoulou A, Kouis P, Middleton N, Kolokotroni O, Karpathios T, Nicolaidou P, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms and vitamin D levels with asthma and atopy in Cypriot adolescents: a case-control study. *Multidiscip Respir Med.* 2015;10(1):26.
227. Agliardi C, Guerini FR, Bolognesi E, Zanzottera M, Clerici M. VDR Gene Single Nucleotide Polymorphisms and Autoimmunity: A Narrative Review. *Biology (Basel).* 2023;12(7):916.
228. Wjst M. Variants in the vitamin D receptor gene and asthma. *BMC Genet.* 2005;6(1):2.
229. Poon AH, Laprise C, Lemire M, Montpetit A, Sinnett D, Schurr E, et al. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(9):967–73.
230. Bai L, Qu C, Feng Y, Liu G, Li X, Li W, Yu S. Evidence of a casual relationship between vitamin D deficiency and hypertension: a family-based study. *Hypertens Res.* 2022;45(11):1814–1822.
231. Rigby WF, Stacy T, Fanger MW. Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol). *J Clin Invest.* 1984;74(4):1451–5.
232. Grossi de Oliveira AL, Chaves AT, Cardoso MS, Pinheiro GRG, Antunes DE, Grossi MAF, et al. Reduced vitamin D receptor (VDR) and cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene expression contribute to the maintenance of inflammatory immune response in leprosy patients. *Microbes Infect.* 2022;24(6-7):104981.
233. Ragab D, Soliman D, Samaha D, Yassin A. Vitamin D status and its modulatory effect on interferon gamma and interleukin-10 production by peripheral blood mononuclear cells in culture. *Cytokine.* 2016;85:5–10.
234. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol.* 2009;183(9):5458–67.
235. Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med.* 2001;194(6):847–53.
236. Hirahara K, Liu L, Clark RA, Yamanaka K ichi, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. The majority of human peripheral blood CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors. *J Immunol.* 2006;177(7):4488–94.
237. Hou C, Zhu X, Chang X. Correlation of vitamin D receptor with bronchial asthma in children. *Exp Ther Med.* 2018;15(3):2773–6.
238. Han JC, Du J, Zhang YJ, Qi GB, Li HB, Zhang YJ, et al. Vitamin D receptor polymorphisms may contribute to asthma risk. *Journal of Asthma.* 2016;53(8):790–800.
239. Despotovic M, Jevtovic Stoimenov T, Stankovic I, Basic J, Pavlovic D. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Serbian Patients With Bronchial Asthma: A Case-Control Study. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2017;118(11):3986–92.

240. Jensen ME, Mailhot G, Alos N, Rousseau E, White JH, Khamessan A, et al. Vitamin D intervention in preschoolers with viral-induced asthma (DIVA): a pilot randomised controlled trial. *Trials*. 2016;17(1):353.
241. Tuncel G, Temel SG, Ergoren MC. Strong association between VDR FokI (rs2228570) gene variant and serum vitamin D levels in Turkish Cypriots. *Mol Biol Rep*. 2019;46(3):3349–55.
242. Zhang W, Xu Y. Association Between Vitamin D Receptor Gene Polymorphism rs2228570 and Allergic Rhinitis. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2020;13:327–35.
243. Kilic M, Ecin S, Taskin E, Sen A, Kara M. The Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Asthmatic Children: A Case-Control Study. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol*. 2019;32(2):63–9.
244. Bouillon R, Schuit F, Antonio L, Rastinejad F. Vitamin D Binding Protein: A Historic Overview. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;10:910.
245. Haddad JG. Plasma vitamin D-binding protein (Gc-globulin): multiple tasks. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;53(1–6):579–82.
246. Rozmus D, Ciesielska A, Płomiński J, Grzybowski R, Fiedorowicz E, Kordulewska N, et al. Vitamin D Binding Protein (VDBP) and Its Gene Polymorphisms—The Risk of Malignant Tumors and Other Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):7822.
247. Hagenfeldt Y, Carlström K, Berlin T, Stege R. Effects of orchidectomy and different modes of high dose estrogen treatment on circulating “free” and total 1,25-dihydroxyvitamin D in patients with prostatic cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991;39(2):155–9.
248. Møller UK, Streym S, Heickendorff L, Mosekilde L, Rejnmark L. Effects of 25OHD concentrations on chances of pregnancy and pregnancy outcomes: a cohort study in healthy Danish women. *Eur J Clin Nutr*. 2012;66(7):862–8.
249. Møller UK, Streym S við, Jensen LT, Mosekilde L, Schoenmakers I, Nigdikar S, et al. Increased plasma concentrations of vitamin D metabolites and vitamin D binding protein in women using hormonal contraceptives: a cross-sectional study. *Nutrients*. 2013;5(9):3470–80.
250. Bratke K, Wendt A, Garbe K, Kuepper M, Julius P, Lommatzsch M, et al. Vitamin D binding protein and vitamin D in human allergen-induced endobronchial inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2014;177(1):366–72.
251. 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.
252. 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.
253. 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
254. Lafi ZM, Irshaid YM, El-Khateeb M, Ajlouni KM, Hyassat D. Association of rs7041 and rs4588 Polymorphisms of the Vitamin D Binding Protein and the rs10741657 Polymorphism of CYP2R1 with Vitamin D Status Among Jordanian Patients. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2015;19(11):629–36.
255. Perna L, Felix JF, Breitling LP, Haug U, Raum E, Burwinkel B, et al. Genetic Variations in the Vitamin D Binding Protein and Season-Specific Levels of Vitamin D Among Older Adults. *Epidemiology*. 2013;24(1):104.

256. Weinhold A, Obeid R, Vogt T, Reichrath J. Prospective Investigation of 25(OH)D3 Serum Concentration Following UVB Narrow Band Phototherapy in Patients with Psoriasis and Atopic Dermatitis. *Anticancer Research*. 2016;36(3):1439–44.
257. Rozmus D, Plomiński J, Augustyn K, Cieślińska A. rs7041 and rs4588 Polymorphisms in Vitamin D Binding Protein Gene (VDBP) and the Risk of Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(2):933.
258. Elkum N, Alkayal F, Noronha F, Ali MM, Melhem M, Al-Arouj M, et al. Vitamin D insufficiency in Arabs and South Asians positively associates with polymorphisms in GC and CYP2R1 genes. *PLoS One*. 2014;9(11):e113102.
259. Zhang TP, Chen SS, Zhang GY, Shi SJ, Wei L, Li HM. Association of vitamin D pathway genes polymorphisms with pulmonary tuberculosis susceptibility in a Chinese population. *Genes Nutr*. 2021;16(1):6.
260. Böhme 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.
261. 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.
262. 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):2851-2874
263. 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):1907-1947.
264. Bauer P, Henni S, Dörr O, Bauer T, Hamm CW, Most A. High prevalence of vitamin D insufficiency in professional handball athletes. *The Physician and Sportsmedicine*. 2019;47(1):71–7.
265. 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.
266. Lietuvos sveikatos statistika / Health Statistics of Lithuania - Higienos institutas [Internet]. [cited 2023 Feb 6]. Available from: <https://www.hi.lt/lt/lietuvos-sveikatos-statistika-health-statistics-of-lithuania.html>
267. Williams H, Robertson C, Stewart A, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson R, et al. Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the international study of asthma and allergies in childhood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1999;103(1):125–38.
268. Wong QYA, Lim JJ, Ng JY, Malipeddi P, Lim YYE, Sio YY, et al. An updated prevalence of asthma, its phenotypes, and the identification of the potential asthma risk factors among young Chinese adults recruited in Singapore. *World Allergy Organ J*. 2023;16(3):100757.
269. Zhu Y, Jing D, Liang H, Li D, Chang Q, Shen M, et al. Vitamin D status and asthma, lung function, and hospitalization among British adults. *Front Nutr*. 2022;9:954768.
270. Baek JH, Shin YH, Chung IH, Kim HJ, Yoo EG, Yoon JW, et al. The Link between Serum Vitamin D Level, Sensitization to Food Allergens, and the Severity of Atopic Dermatitis in Infancy. *The Journal of Pediatrics*. 2014;165(4):849-854.
271. Fu H, Li Y, Huang H, Wang D. Serum Vitamin D Level and Efficacy of Vitamin D Supplementation in Children with Atopic Dermatitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2022;2022:e9407888.

272. Rosser FJ, Han YY, Forno E, Bacharier LB, Phipatanakul W, Guilbert TW, et al. Effect of vitamin D supplementation on total and allergen-specific IgE in children with asthma and low vitamin D levels. *J Allergy Clin Immunol.* 2022;149(1):440-444.e2.
273. Keet CA, McCormack MC, Peng RD, Matsui EC. Age- and atopy-dependent effects of vitamin D on wheeze and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2011;128(2):414-416.e5.
274. Mansour NO, Mohamed AA, Hussein M, Eldemiry E, Daifalla A, Hassanin S, et al. The impact of vitamin D supplementation as an adjuvant therapy on clinical outcomes in patients with severe atopic dermatitis: A randomized controlled trial. *Pharmacology Research & Perspectives.* 2020;8(6):e00679.
275. Park JS, Kim M, Sol IS, Lee KS, Park S, Yang HJ, et al. Effect of Vitamin D on the Treatment of Atopic Dermatitis With Consideration of Heterogeneities: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2022;15(2):262–70.
276. Hasan HA, AbuOdeh RO, Muda WAMBW, Mohamed HBJB, Samsudin AR. Association of Vitamin D receptor gene polymorphisms with metabolic syndrome and its components among adult Arabs from the United Arab Emirates. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* 2017;11:S531–7.
277. Kerr Whitfield G, Remus LS, Jurutka PW, Zitzer H, Oza AK, Dang HTL, et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2001;177(1):145–59.
278. Al-Nahas Z. 25-hydroxyvitamin D3 deficiency and vitamin D receptor polymorphisms in Egyptian patients with Behçet's disease: a pilot study. *Rheumatology.* 2019; 58(2):60
279. González-Tarancón R, Goñi-Ros N, Salvador-Rupérez E, Hernández-Martin Á, Izquierdo-Álvarez S, Puzo-Foncillas J, et al. Association Between VDR and CYP24A1 Polymorphisms, Atopic Dermatitis, and Biochemical Lipid and Vitamin D Profiles in Spanish Population: Case-Control Study. *JMIR Dermatology.* 2023;6:e39567.
280. Hutchinson K, Kerley CP, Faul J, Greally P, Coghlan D, Louw M, et al. Vitamin D receptor variants and uncontrolled asthma. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2018;50(3):108–16.
281. Hussein MM, Mohamed EM, Kamal TM, Deraz TE. Increased susceptibility to complicated pneumonia among egyptian children with FokI (rs2228570), not TaqI (rs731236), vitamin D receptor gene polymorphism in association with vitamin D deficiency: a case-control study. *BMC Pediatr.* 2023;23(1):394.
282. Ramos-Lopez E, Jansen T, Ivaskevicius V, Kahles H, Klepzig C, Oldenburg J, et al. Protection from type 1 diabetes by vitamin D receptor haplotypes. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1079:327–34.
283. Ashok N, Saraswathy R. Association of polymorphisms of vitamin D gene in children with asthma and allergic rhinitis – Hospital based study. *Heliyon.* 2023;10(1):e23673.
284. Al-Daghri NM, Mohammed AK, Bukhari I, Rikli M, Abdi S, Ansari MGA, et al. Efficacy of vitamin D supplementation according to vitamin D-binding protein polymorphisms. *Nutrition.* 2019;63–64:148–54.
285. Tokura Y, Phadungsaksawasdi P, Ito T. Atopic dermatitis as Th2 disease revisited. *Journal of Cutaneous Immunology and Allergy.* 2018;1(5):158–64.
286. Harker JA, Lloyd CM. T helper 2 cells in asthma. *J Exp Med.* 2023;220(6):e20221094.
287. Moaaz M, Youssry S, Elfatry A, El Rahman MA. Th17/Treg cells imbalance and their related cytokines (IL-17, IL-10 and TGF-β) in children with autism spectrum disorder. *Journal of Neuroimmunology.* 2019;337:577071.
288. Shi Y heng, Shi G chao, Wan H ying, Jiang L hua, Ai X yan, Zhu H xing, et al. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma. *Chin Med J (Engl).* 2011;124(13):1951–6.

289. Li X, Mai J, Virtue A, Yin Y, Gong R, Sha X, et al. IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine--a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PLoS One*. 2012;7(3):e33628.
290. Zhao R, Zhang W, Ma C, Zhao Y, Xiong R, Wang H, et al. Immunomodulatory Function of Vitamin D and Its Role in Autoimmune Thyroid Disease. *Front Immunol*. 2021;12:574967
291. Wei R, Christakos S. Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. *Nutrients*. 2015;7(10):8251–60.
292. Mailhot G, White JH. Vitamin D and Immunity in Infants and Children. *Nutrients*. 2020;12(5):1233.
293. Kang SW, Kim SH, Lee N, Lee WW, Hwang KA, Shin MS, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Promotes FOXP3 Expression via Binding to Vitamin D Response Elements in Its Conserved Noncoding Sequence Region. *The Journal of Immunology*. 2012;188(11):5276–82.
294. Kuti BP, Kuti DK. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and inflammatory cytokines in Nigerian children with asthma. *J Asthma*. 2021;58(5):604–13.
295. Keles E, Ozkara S, Ilhan N, Gungor H, Karlidag T, Yalcin S. The Relationship between Th1/Th2 Balance and 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D3 in Patients with Allergic Rhinitis. *Turk Arch Otorhinolaryngol*. 2016;53(4):139–43.
296. Han YY, Forno E, Boutaoui N, Canino G, Celedón JC. Vitamin D insufficiency, TH2 cytokines, and allergy markers in Puerto Rican children with asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2018;121(4):497-498.
297. Amorim CLCG de, Oliveira JM de, Rodrigues A, Furlanetto KC, Pitta F. Vitamin D: association with eosinophil counts and IgE levels in children with asthma. *J Bras Pneumol*. 2020;47(1):e20200279.
298. Wierzbicka JM, Piotrowska A, Purzycka-Bohdan D, Olszewska A, Nowak JI, Szczerkowska-Dobosz A, et al. The Effects of Vitamin D on the Expression of IL-33 and Its Receptor ST2 in Skin Cells; Potential Implication for Psoriasis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):12907.
299. Bonanno A, Gangemi S, La Grutta S, Malizia V, Riccobono L, Colombo P, et al. 25-Hydroxyvitamin D, IL-31, and IL-33 in Children with Allergic Disease of the Airways. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:520241.
300. Cheon BR, Shin JE, Kim YJ, Shim JW, Kim DS, Jung HL, et al. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and interleukin-31 levels, and the severity of atopic dermatitis in children. *Korean J Pediatr*. 2015;58(3):96–101.
301. Mehrani Y, Morovati S, Tieu S, Karimi N, Javadi H, Vanderkamp S, et al. Vitamin D Influences the Activity of Mast Cells in Allergic Manifestations and Potentiates Their Effector Functions against Pathogens. *Cells*. 2023;12(18):2271.
302. Bendix M, Dige A, Deleuran B, Dahlerup JF, Jørgensen SP, Bartels LE, et al. Flow cytometry detection of vitamin D receptor changes during vitamin D treatment in Crohn's disease. *Clin Exp Immunol*. 2015;181(1):19–28.
303. Kongsbak M, von Essen MR, Boding L, Levring TB, Schjerling P, Lauritsen JPH, et al. Vitamin D up-regulates the vitamin D receptor by protecting it from proteasomal degradation in human CD4⁺ T cells. *PLoS One*. 2014;9(5):e96695.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Straipsniai, kuriuose paskelbti tyrimo rezultatai

Leidiniuose, referuojamuose duomenų bazėje Clarivate Analytics Web of Science ir turinčiuose citavimo rodiklį:

1. **Bastytė Daina**; Tamašauskienė Laura; Stakaitienė Ieva; Briedė Kamilija; Ugenskienė Rasa; Valiukevičienė Skaidra; Gradauskienė Brigita. Relation of T Cell Profile with Vitamin D Receptor and Vitamin D-Binding Protein Gene Polymorphisms in Atopy // International Journal of Molecular sciences, 2024, t. 25, nr. 16, p. 1-17, ISSN 1422-0067, 1661-6596. doi:10.3390/ijms25169021. [Citav. rodiklis: 4.9, bendr. cit. rod.: 5.664, kvartilis: Q1 (2023. InCites JCR SCIE)]
2. **Bastytė Daina**; Tamašauskienė Laura; Stakaitienė Ieva; Ugenskienė Rasa; Gradauskienė Brigita. The Association of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms with Vitamin D, Total IgE, and Blood Eosinophils in Patients with Atopy // Biomolecules, 2024, t. 14, nr. 2, p. 1-17. doi:10.3390/biom14020212. [Citav. rodiklis: 4.8, bendr. cit. rod.: 5.136, kvartilis: Q1 (2023. InCites JCR SCIE)].
3. **Bastytė Daina**; Tamašauskienė Laura; Golubickaitė Ieva; Ugenskienė Rasa; Šitkauskienė Brigita. Vitamin D receptor and vitamin D binding protein gene polymorphisms in patients with asthma: a pilot study // BMC Pulmonary Medicine, 2023, t. 23, nr. 1, p. 1-10. doi:10.1186/s12890-023-02531-3. [Citav. rodiklis: 2.6, bendr. cit. rod.: 4.177, kvartilis: Q2 (2023. InCites JCR SCIE)].

Kiti straipsniai

1. Paramonova Natalia; Trapina Ilva; Gradauskienė Brigita; Plavina Samanta; Tamašauskienė Laura; **Bastytė Daina**; Rumba-Rozenfelde Ingrida; Tapina Sandra; Stakaitienė Ieva; Ugenskienė Rasa; Shih-Hsin Wu Lawrence; Wang Jiu-Yao; Hsieh Miao-Hsi; Chen Pei-Chi; Sjakste Nikolajs. Genetic Diversity in Bronchial Asthma Susceptibility: Exploring the Role of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Varied Geographic Contexts // International Journal of Molecular Sciences, 2024, t. 25, nr. 3, p. 1-18. doi:10.3390/ijms25031943. [Citav. rodiklis: 4.9, bendr. cit. rod.: 5.664, kvartilis: Q1 (2023. InCites JCR SCIE)].
2. Tamašauskienė Laura; Gintauskienė Viltė Marija; **Bastytė Daina**; Šitkauskienė Brigita. Role of IL-22 in persistent allergic airway diseases caused by house dust mite: a pilot study // BMC pulmonary medicine. London : BioMed Central, 2021, vol. 21, no. 1, p. 1-8. doi:10.1186/

s12890-021-01410-z. [Citav. rodiklis: 3.32, bendr. cit. rod.: 6.768, kvartilis: Q3 (2021. InCites JCR SCIE)].

3. **Bastytė Daina**; Šitkauskienė Brigita. YKL-40 baltymo ryšys su astma: sisteminė literatūros apžvalga // *Laboratorinė medicina = Laboratory medicine*. Vilnius : Lietuvos laboratorinės medicinos draugija : Lietuvos žmogaus genetikos draugija, 2021, t. 23, Nr. 4(90), p. 221-227.

Mokslinės konferencijos, kuriose paskelbti tyrimo rezultatai

1. **Bastytė, Daina**; Tamašauskienė, Laura; Ugenskienė, Rasa; Gradauskienė, Brigita. Association between vitamin D receptor gene single nucleotide polymorphisms and atopy // *International Health Sciences Conference for All (IHSC for All) “Precision Medicine” : Abstract book 2024 : [March 25-26, 2024, Kaunas] / Edited by Ignas Lapeikis, Livija Petrokaitė*, p. 467 - 468, ISSN 3030-0711. Prieiga per internetą: <<https://smd.lt/uploads/publications/IHSCforAll2024.pdf>> <<https://hdl.handle.net/20.500.12512/243260>>. [T1e] [M.kr.: M001, N010].
2. **Bastytė, Daina**; Tamašauskienė, Laura; Briedė, Kamilija; Valiukevičienė, Skaidra; Šitkauskienė, Brigita. T regulatory and TH17 cells in atopic dermatitis and allergic asthma // *Allergy : Abstracts from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology Hybrid Congress : 9–11 June, 2023*, t. 78, nr. Suppl. 112, p. 313 - 313, ISSN 0105-4538, 1398-9995. Prieiga per internetą: <<https://hdl.handle.net/20.500.12512/241255>>. Science Citation Index Expanded (Web of Science); Scopus; MEDLINE; PubMed; Index Medicus. [T1a] [M.kr.: M001] [Citav. rodiklis: 12.6, bendr. cit. rod.: 5.127, kvartilis: Q1 (2023. InCites JCR SCIE)].
3. **Bastytė, Daina**; Tamašauskienė, Laura; Golubickaitė, Ieva. Vitamino D ir vitamino D surišančio baltymo geno polimorfizmo rs4725 vaidmuo atopinių ligų metu // *Tarptautinė mokslinė-praktinė konferencija “Alerginių ir imuninių ligų ypatumai 2023” : Vilnius, 2023m spalio 13d. : Konferencijos medžiaga / Lietuvos alergijos ir astmos asociacija. Vilniaus Universiteto Medicinos fakultetas. Lietuvos Sveikatos Mokslų universitetas*, p. 17 - 18. Prieiga per internetą: <<https://hdl.handle.net/20.500.12512/239268>>. [T2] [M.kr.: M001].
4. **Bastytė, Daina**; Tamašauskienė, Laura; Šitkauskienė, Brigita. CD4+CD25+FoxP3+ T reguliaciniai limfocitai ir su jais susiję citokinai sergantiesiems atopinėmis ligomis = CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory lymphocytes and their associated cytokines in atopic diseases // *Pulmonologija ir alergologija = Pulmonology and Allergology : Mokslinės tezės*. Kaunas : UAB „Vitae Litera“, 2023, t. 7, Nr. 1,

- p. 73-74, ISSN 2538-7324. Prieiga per internetą: <<https://hdl.handle.net/20.500.12512/118918>>. Index Copernicus. [T1c] [M.kr.: M001].
5. **Bastytė, Daina**; Tamašauskienė, Laura; Šitkauskienė, Brigita. Role of serum transforming growth factor - β 1 (TGF- β 1) in atopic diseases // Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM : Special supplement: WorldLab - EuroMedLabRoma 2023: abstracts issue – 25th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) WorldLab and 25th European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) EuroMedLab and 55th Annual Congress of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC) : May 21-25, 2023, Rome, Italy / The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Berlin ; Boston : Walter De Gruyter, 2023, vol. 61, iss. suppl. 1, p. S1780-S1780, ISSN 1434-6621, 1437-4331. doi:10.1515/cclm-2023-7057. Prieiga per internetą: <<https://hdl.handle.net/20.500.12512/118939>> <10.1515/cclm-2023-7057>. MEDLINE (PubMed); PubMed; Scopus; Science Citation Index Expanded. [T1a] [M.kr.: M001] [Citav. rodiklis: 3.8, bendr. cit. rod.: 2.611, kvartilis: Q1 (2023. InCites JCR SCIE)].
 6. **Bastytė, Daina**; Tamašauskienė, Laura; Bagdonas, Dovydas; Šitkauskienė, Brigita. T Cell Phenotypes and their Relation to Vitamin D Level in Atopic Diseases // ESCCA 2022 congress : abstracts : Belfast, Northern Ireland, September 21-24, 2022 / European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA). Amsterdam : European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA), 2022, p. 42-43. Prieiga per internetą: <<https://hdl.handle.net/20.500.12512/115649>>. [T2] [M.kr.: M001].
 7. **Bastytė, Daina**; Tamašauskienė, Laura; Bagdonas, Dovydas; Šitkauskienė, Brigita. Th limfocitų fenotipo vertinimas sergantiesiems atopinėmis ligomis = Analysis of Th lymphocyte phenotype in patients with atopic diseases // Pulmonologija ir alergologija = Pulmonology and Allergology : Mokslinės tezės. Kaunas : UAB „Vitae Litera“, 2022, t. 6, Nr. 1, p. 69-70, ISSN 2538-7324. Prieiga per internetą: <<https://hdl.handle.net/20.500.12512/114939>>. Index Copernicus. [T1c] [M.kr.: M001].
 8. **Bastytė, Daina**; Tamašauskienė, Laura; Bagdonas, Dovydas; Šitkauskienė, Brigita. T limfocitų fenotipo sąsajos su eozinofilų ir IgE kiekiu esant įsijautrinimui namų dulkių erkių alergenams // Konferencija [tarptautinė mokslinė-praktinė] Alergologinių ligų diagnostikos ir gydymo ypatumai Covid ir Post-Covid laikmetyje : tezių knyga : 2022 m. spalio 21 d., Vilnius / Lietuvos alergijos ir astmos asociacija. Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas. Lietuvos sveikatos mokslų universitetas. Vilnius : Lietuvos alergijos ir astmos asociacija, 2022, p. 10-11.

Prieiga per internetą: <<https://hdl.handle.net/20.500.12512/115923>>. [T2] [M.kr.: M001].

9. **Bastytė, Daina**; Tamašauskienė, Laura; Golubickaitė, Ieva; Ugenskienė, Rasa; Šitkauskienė, Brigita. Vitamin D and its receptor gene polymorphisms in atopy and asthma // Allergy : Special Issue: Abstracts from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) Hybrid Congress : 1-3 July 2022, Prague, Czechia / European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). Hoboken : Wiley, 2022, vol. 78, iss. suppl. 111, p. 185-185, ISSN 0105-4538, 1398-9995. doi:10.1111/all.15616. Prieiga per internetą: <<https://hdl.handle.net/20.500.12512/119260>> <10.1111/all.15616>. ISI Master Journal List; MEDLINE (PubMed). [T1a1] [M.kr.: M001] [Citav. rodiklis: 12.4, bendr. cit. rod.: 6.3, kvartilis: Q1 (2022. InCites JCR SCIE)].
10. **Bastytė, Daina**; Tamašauskienė, Laura; Golubickaitė, Ieva; Ugenskienė, Rasa; Šitkauskienė, Brigita. Vitamino D receptoriaus ir vitamino D surišančio baltymo genų polimorfizmų sąsajos su vitamino D ir IgE kiekiu sergant astma = Association of Vitamin D receptor and Vitamin D-binding protein gene polymorphisms with Vitamin D and total IgE levels in asthma // Pulmonologija ir alergologija = Pulmonology and Allergology : Mokslinės tezės. Kaunas : UAB „Vitae Litera“, 2021, t. 5, Nr. 1, p. 79-80, ISSN 2538-7324. Prieiga per internetą: <<https://hdl.handle.net/20.500.12512/111330>>. Index Copernicus. [T1c] [M.kr.: M001].

PRIEDAI

1 priedas



KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickėvičiaus g. 9, LT 44307 Kaunas, tel. (+370) 37 32 68 89; el.paštas: kaunorbtek@ismuni.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2020-07-15 Nr. BE-2-74

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: „Vitamino D ir jo receptorių genų polimorfizmų palyginamasis tyrimas tarp Lietuvos, Latvijos ir Taivano vaikų ir suaugusiųjų, sergančių atopiniu dermatitu ir astma“	
Protokolo Nr.:	LLTADA
Data:	2020-06-16
Versija:	3
Asmens informavimo forma	Versija 2; data 2020-06-16
Pagrindinis tyrėjas:	Prof. dr. Brigita Šitkauskienė
Biomedicininio tyrimo vieta:	Lietuvos Sveikatos mokslų Universiteto ligoninė Kauno klinikos
Ištaigos pavadinimas:	Eivenių g. 2, LT-50161 Kaunas
Adresas:	

Išvada:

Kauno regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto posėdžio, įvykusio **2020 m. liepos mėn. 8 d.** (protokolo Nr. BE-10-7) sprendimu pritaroma biomedicininio tyrimo vykdymui.

Mokslinio eksperimento vykdytojai įsipareigoja: (1) nedelsiant informuoti Kauno Regioninį biomedicininių Tyrimų Etikos komitetą apie visus nenumatytus atvejus, susijusius su studijos vykdymu, (2) iki sausio 15 dienos – pateikti metinį studijos vykdymo apibendrinimą bei, (3) per mėnesį po studijos užbaigimo, pateikti galutinį pranešimą apie eksperimentą.

Kauno regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto nariai			
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis	Dalyvavo posėdyje
1.	Prof. Edgaras Stankevičius	Fiziologija, farmakologija	Taip
2.	Prof. Skaidrius Miliauskas	Pulmunologija, vidaus ligos	Ne
3.	Med. dr. Jonas Andriuskevičius	Chirurgija	Taip
4.	Doc. Gintautas Gumbrevičius	Klinikinė farmakologija	Taip
5.	Prof. Kęstutis Petrikonis	Neurologija	Taip
6.	Dr. Ramunė Kasperavičienė	Filologija	Taip
7.	Žydrūnė Luneckaitė	Visuomenės sveikata	Taip
8.	Aušra Degutytė	Visuomenės sveikata	Ne
9.	Jurgita Laurinaitytė	Teisė	Ne

Kauno regioninis biomedicininių tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininių tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros klinikinės praktikos taisyklėmis.

Kauno RBTEK pirmininkas



Prof. Edgaras Stankevičius



KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickevičiaus g. 9, LT 44307 Kaunas, tel. +370 37 32 72 29; el. paštas: kaunorbtek@ismuni.lt

PRITARIMAS BIOMEDICININIO TYRIMO PAPILDYMIUI

2021-04-14 Nr. P1-BE-2-74/2020

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: „Vitamino D ir jo receptorių genų polimorfizmų palyginamasis tyrimas tarp Lietuvos, Latvijos ir Taivano vaikų ir suaugusiųjų, sergančių atopiniu dermatitu ir astma“ (leidimas atlikti biomedicininį tyrimą išduotas 2020-07-15 Nr. BE-2-74).	
Pagrindinis tyrėjas: Biomedicininio tyrimo vieta:	Prof. dr. Brigita Šitkauskienė Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninė Kauno klinikos, Imunologijos ir alergologijos klinika Eivenių g. 2, LT-50161, Kaunas

Peržiūrėti šie [✓] su minėtu tyrimu susiję dokumentai:

[✓] Biomedicininio tyrimo „Vitamino D ir jo receptorių genų polimorfizmų palyginamasis tyrimas tarp Lietuvos, Latvijos ir Taivano vaikų ir suaugusiųjų, sergančių atopiniu dermatitu ir astma“ pagrindinio tyrėjo prašymas dėl leidimo papildyti biomedicininį tyrimą;

[✓] Paraiška biomedicininiam tyrimui „Vitamino D ir jo receptorių genų polimorfizmų palyginamasis tyrimas tarp Lietuvos, Latvijos ir Taivano vaikų ir suaugusiųjų, sergančių atopiniu dermatitu ir astma“;

[✓] Į tyrimą „Vitamino D ir jo receptorių genų polimorfizmų palyginamasis tyrimas tarp Lietuvos, Latvijos ir Taivano vaikų ir suaugusiųjų, sergančių atopiniu dermatitu ir astma“ įtraukiamos tyrėjos Dainos Bastytės gyvenimo aprašymas.

[✓] **Nutarta: Pritarti biomedicininio tyrimo papildymui**

Kauno regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto nariai		
Nr.	Vardas, pavardė	Veiklos sritis
1.	Doc. dr. Gintautas Gumbrevičius	Klinikinė farmakologija
2.	Prof. dr. Kęstutis Petrikonis	Neurologija
3.	Dr. Saulius Raugelė	Chirurgija
4.	Dr. Lina Jankauskaitė	Pediatrija
5.	Prof. dr. Džilda Veličkienė	Endokrinologija
6.	Doc. dr. Eimantas Peičius	Visuomenės sveikata
7.	Aušra Degutytė	Visuomenės sveikata
8.	Dr. Žydrūnė Luneckaitė	Visuomenės sveikata
9.	Viktorija Bučinskaitė	Teisė

Kauno regioninis biomedicininių tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininių tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros klinikinės praktikos taisyklėmis.

Pirmininkas



Doc. dr. Gintautas Gumbrevičius

Rīga, July 21 2024

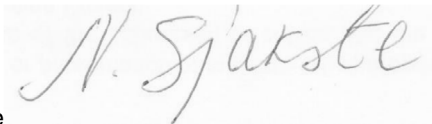
Agreement to Use Data from Latvia–Lithuania–Taiwan Cooperation Project

I agree that Daina Bastyte can use the data collected by Lithuanian scientists involved in the Latvia–Lithuania–Taiwan Cooperation Project, titled 'Comparative study of vitamin D and its receptor gene polymorphisms in Lithuanian, Latvian, and Taiwanese children and adults with atopic dermatitis and asthma,' for her thesis and academic research.

The data will be used solely for the purpose stated above and will be handled in accordance with all applicable data privacy and security guidelines.

The following terms and conditions will be observed:

1. The data will be used exclusively for Daina Bastyte's thesis and academic research.
2. The data will be stored securely and will not be shared with unauthorized parties.
3. Any publication or presentation of the data will appropriately acknowledge the contributions of the Lithuanian scientists and the Latvia–Lithuania–Taiwan Cooperation Project.

A handwritten signature in black ink, reading "N. Sjakste". The signature is written in a cursive style and is centered on a light-colored rectangular background.

Professor Nikolajs Sjakste

Faculty of Medicine and Life Sciences, University of Latvia

Agreement to Use Data from Latvia–Lithuania–Taiwan Cooperation Project

I agree that Daina Bastyte can use the data collected by Lithuanian scientists involved in the Latvia–Lithuania–Taiwan Cooperation Project, titled 'Comparative study of vitamin D and its receptor gene polymorphisms in Lithuanian, Latvian, and Taiwanese children and adults with atopic dermatitis and asthma,' for her thesis and academic research. The data will be used solely for the purpose stated above and will be handled in accordance with all applicable data privacy and security guidelines.

The following terms and conditions will be observed:

1. The data will be used exclusively for Daina Bastyte's thesis and academic research.
2. The data will be stored securely and will not be shared with unauthorized parties.
3. Any publication or presentation of the data will appropriately acknowledge the contributions of the Lithuanian scientists and the Latvia–Lithuania–Taiwan Cooperation Project.

Jiu-Yao Wang, MD, DPhil



(Organization)

Jiu-Yao Wang (王志堯), MD, DPhil. (Oxon.)

Chair Professor of Pediatrics

Director, Research Center of Allergy, Immunology, and Microbiome (A.I.M.),

Superintendent, China Medical University Children's Hospital (CMUCH), Taichung, Taiwan.

President, Asia Pacific Association of Allergy, Asthma, and Clinical Immunology (APAAACI)



中國醫藥大學 兒童醫院
C M U C H I L D R E N ' S H O S P I T A L

CURRICULUM VITAE

Name, Surname: Daina Bastytė
E-mail: daina.bastyte@lsmu.lt

Education:

2020–2024 Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania
Ph.D. student in Biology

2017–2019 Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania
M. Sc. in Biology of Laboratory Medicine

2012–2015 Vytautas Magnus University, Kaunas, Lithuania.
M. Sc. in Molecular biology

2009–2012 Kaunas College, Kaunas, Lithuania
B. Sc. in Public health, Laboratory diagnostics

Work Experience:

2021– present Department of Immunology and allergology, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania.
Younger researcher

2021– present Department of Immunology and allergology. Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania.
Younger assistant

2019– present Department of Immunology and Allergology. Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas Clinic, Kaunas, Lithuania.
Medical Biologist

2012– 2019 Department of Laboratory medicine. Hospital of Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas Clinics, Kaunas, Lithuania
Biomedical technologist

Participation in Research Projects:

2021 – 2023 Laboratory of Immunology, Department of immunology and allergology, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania.
International project “Comparative study of vitamin D and its receptor gene polymorphisms in Lithuanian, Latvian, and Taiwanese children and adults with atopic dermatitis and asthma”.
Funded by Research Council of Lithuania
(project reg. no. S-LLT-20-1, P-LLT-20-4)
Younger researcher

Membership:

2021– present Member of European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)

2019– present Member of European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI).

2015– present Member of “Lietuvos laboratorinės medicinos draugija”

Awards:

- 2024 Vilnius, Lithuania, conference of Lithuanian Allergy and Asthma Association (LAAA) “Alerginių ir imuninių ligų ypatumai 2024”. (First place in the scientific oral presentation session)
- 2024 Zakopane, Poland, “Immunology Winter School 2024”. (Travel grant).
- 2023 Vilnius, Lithuania, conference of Lithuanian Allergy and Asthma Association (LAAA) “Alerginių ir imuninių ligų ypatumai 2023”. (Third place in the scientific oral presentation session)
- 2023 Kaunas, Lithuania, Annual conference of the Lithuanian Society of Pulmonologists and Allergists (LPAD) “Pulmonologija ir alergologija 2023”. (First place in the scientific oral presentation session)
- 2022 Vilnius, Lithuania, conference of Lithuanian Allergy and Asthma Association (LAAA) “Alergologinių ligų diagnostikos ir gydymo ypatumai Covid ir Post-Covid laikmetyje”. (First place in the scientific oral presentation session)
- 2022 2022 Kaunas, Lithuania, Annual conference of the Lithuanian Society of Pulmonologists and Allergists (LPAD) “Pulmonologija ir alergologija 2022”. (Third place in the scientific oral presentation session)

PADĖKA

Iš visos širdies dėkoju visiems, padėjusiems paruošti šią daktaro disertaciją.

Nuoširdžiai dėkoju doktorantūros vadovei prof. dr. Brigitai Gradauskienei už skirtą galimybę dirbti Imunologijos ir alergologijos klinikoje ir sudarytas sąlygas atlikti doktorantūros tyrimus bei dalyvauti tarptautiniuose projektuose. Dėkoju už visą skirtą savo laiką ir už tai, kad išmokė rašyti straipsnius, už mokslines idėjas, pastabas ir skatinimą tobulėti siekiant užsibrėžtų tikslų.

Dėkoju gydytojoms alergologėms ir klinikinėms imunologėms, ypač dr. Laurai Tamašauskienei už įkvėpimą būnat puikiu pavyzdžiu ir pagalbą ieškant tiriamųjų, atitinkančių atrankos kriterijus, bei Justinai Šematonytei ir doc. Editai Gasiūnienei, kurios reikšmingai prisidėjo renkant tiriamųjų grupes.

Ypatingai dėkoju prof. dr. Rasai Ugenskienei, dr. Ievai Stakaitienei ir visai Genetikos ir molekulinės medicinos klinikai už suteiktas konsultacijas, genetinių tyrimų atlikimą ir pagalbą interpretuojant gautus rezultatus.

Dėkoju Dovydui Bagdonui už pagalbą kuriant tėkmės citometrijos protokolus.

Dėkoju prof. dr. Skaidrai Valiukevičienei ir Kamilijai Briedei už bendradarbiavimą renkant tiriamųjų grupes.

Esu dėkinga Lietuvos mokslo tarybai ir LSMU Mokslo fondui už reikšmingą finansinę paramą, skirtą reikiamų reagentų įsigijimui ir mokslinių idėjų įgyvendinimui.

Dėkoju visiems Imunologijos ir alergologijos klinikos darbuotojams už nuoširdų palaikymą ir supratingumą.

Dėkoju visiems tyrimo dalyviams, sutikusiems savanoriškai ir neatlygintiškai dalyvauti šiame moksliniame tyrime.

Dėkoju savo draugams, ypač Ryčiui Buzarui už palaikymą ir skatinančius žodžius.

Ypatingai dėkoju savo sesei, bendrosios praktikos slaugytojai Vaivai Bastytei už pagalbą renkant kontrolinę tiriamųjų grupę. Dėkoju mamai Sigitai Bastienei už nuolatinį tikėjimą ir moralinį palaikymą. Labai dėkoju savo gyvenimo vyrui Almantui Pavalkiui už meilę, visapusišką supratimą ir sudarytas sąlygas siekti tikslo.