



Università di Foggia

Scuola di Dottorato in Scienze Mediche, Cliniche e
Sperimentali

Dottorato di ricerca in

**“Immunoreumatologia e Oncologia Clinica e
Sperimentale, Bioetica ed Epidemiologia dei tumori”**

XXVII ciclo

**EFFETTI IN VIVO E IN VITRO DELLA
VITAMINA D NELL'ARTRITE REUMATOIDE**

TUTOR:

Prof. Francesco Paolo Cantatore

DOTTORANDA:

Dott.ssa Annamaria Gaudio

Esame finale Anno Accademico 2014-2015

INDICE

Introduzione	pag.1
Fisiologia della vitamina D	pag.2
Ruolo della vitamina D sul sistema immunitario	pag.7
Artrite reumatoide e ruolo della vitamina D	pag.16
Scopo del lavoro	pag.19
Pazienti e metodi:	
• <i>Valutazione dei livelli circolanti di vitamina D in pazienti affetti da AR e correlazione con attività di malattia, stato funzionale e qualità della vita</i>	pag.20
<i>Risultati</i>	pag.23
• <i>Valutazione degli effetti immunomodulanti della vitamina D in monocito-macrofagi del sangue periferico derivanti pazienti affetti da AR</i>	pag.25
<i>Risultati</i>	pag.33
Discussione	pag.39
Figure	pag.51
Bibliografia	pag.63

INTRODUZIONE

Quando si parla di vitamina D si pensa direttamente ad un sistema endocrino vero e proprio in quanto partecipa unitamente all'ormone paratiroideo ed alla calcitonina alla complessa regolazione omeostatica del metabolismo fosfo-calcico nell'uomo.

La funzione essenziale della vitamina D è quella di mantenere entro i limiti fisiologici i livelli di calcio e del fosforo nel sangue. Per realizzare questo essa va incontro ad un complesso cammino metabolico con conseguente sintesi di specifici metaboliti.

Negli ultimi anni il ruolo della vitamina D ha assunto sempre più importanza non solo nella regolazione del metabolismo osseo e fosfo-calcico, ma anche come agente in grado di interferire con alcune funzioni del sistema immunitario.

FISIOLOGIA DELLA VITAMINA D

La vitamina D può essere acquisita dall'organismo attraverso tre fonti principali: cibo, esposizione solare, integratori alimentari.

I fattori che influenzano il bilancio della vitamina D sono molteplici, tra questi vi sono l'etnia per cui si è osservato che la presenza di maggiore quantità di melanina diminuisce la quota di vitamina D sintetizzata e pertanto i soggetti di colore sono a maggior rischio di carenza della stessa (1).

L'obesità è un fattore di rischio per la carenza di vitamina D, poiché questa vitamina liposolubile è immagazzinata nel tessuto adiposo (2).

I livelli di vitamina D negli obesi aumentano del 50% in meno rispetto ai soggetti non obesi a parità di introito di vitamina D (3).

Altro fattore importante è l'età. Con l'aumentare dell'età si riduce la sintesi di vitamina D a livello della cute, così come si riducono anche i livelli di 7-deidrocolesterolo (1).

Ancora diversi farmaci possono alterare i livelli di vitamina D. I livelli di vitamina D possono essere diminuiti da anticonvulsivanti, corticosteroidi, cimetidina, antitubercolari, teofillina, orlistat, mentre, al contrario, i diuretici tiazidici possono aumentarli (4).

Infine si ricordano le alterazioni della funzionalità renale e/o epatica, lo scarso introito di vitamina D con la dieta, la scarsa esposizione solare ed il malassorbimento (malattie infiammatorie intestinali, celiachia, resezioni gastriche, malattie biliari).

Il ruolo ubiquitario della vitamina D è stato intuito sin dal passato al punto da attribuirle una funzione sistemica nell'organismo umano con meccanismi ormono-simili, confermati anche dalla struttura molecolare della vitamina, che presenta un'impalcatura principale del tutto simile a quella di altri ormoni liposolubili.

La vitamina D è un seco-steroido (steroido caratterizzato dalla rottura di uno dei legami dell'anello steroideo) che, in considerazione della differenza di struttura della sua catena laterale, può essere distinto in due diverse forme biologiche: l'ergocalciferolo (vitamina D₂) e il colecalciferolo (vitamina D₃).

La vitamina D₂ è presente in alcuni vegetali e funghi e pertanto può essere assunta con gli alimenti; la vitamina D₃ è prodotta a livello cutaneo a seguito dell'esposizione ai raggi ultravioletti.

In entrambi i casi essa viene idrossilata a livello epatico in posizione 25 costituendo il 25-idrossicolecalciferolo (25(OH)D₃), che è il metabolita circolante della vitamina D presente in maggiore quantità e più facilmente dosabile.

Il dosaggio del 25(OH)D₃ ematico rappresenta il parametro di riferimento per stimare la riserva di vitamina D dell'organismo.

La maggior parte degli autori concorda col fatto che livelli sierici di 25(OH)D₃ al di sotto di 20 ng/mL (o 50 nmol/L) siano indicativi di una situazione di carenza di vitamina D (5).

A tal proposito, gli studi epidemiologici hanno dimostrato che la carenza di vitamina D è molto frequente in Europa e negli USA dove la sua prevalenza è stimata tra 50 e 80 % della popolazione generale (6).

Il 25(OH)D₃ per divenire un metabolita biologicamente attivo richiede un'ulteriore idrossilazione a livello renale, dove l'enzima 1-alfaidrossilasi determina l'idrossilazione in posizione 1 della molecola, formando il metabolita definitivo attivo, che è l'1,25 diidrossicolecalciferolo (1,25(OH)₂D₃).

L'1,25(OH)₂D₃ si può ritenere un vero e proprio ormone liposolubile ad azione ubiquitaria.

Essa agisce su cellule bersaglio attraverso il legame a specifici recettori nucleari (VDRs), che se attivati interagiscono con specifici elementi responsivi alla vitamina D, con l'attivazione di sequenze di DNA coinvolte nella trascrizione di RNA messaggero codificante per

le proteine leganti il calcio e fattori di crescita coinvolti nel metabolismo fosfo-calcico e altre azioni cellulari.

Pertanto, l'attivazione dei VDRs presenti a livello del piccolo intestino induce un incremento dell'espressione dei canali del calcio, della proteina legante il calcio (calcium binding protein – CBP) e di altre proteine deputate al trasporto attivo del calcio dal lume intestinale al torrente circolatorio.

In ultima analisi la vitamina D riveste un ruolo fondamentale e insostituibile nel promuovere l'assorbimento intestinale del calcio, tappa fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi calcica nel nostro organismo.

I VDRs sono presenti anche sugli osteoblasti ed è proprio l'attivazione di questi recettori osteoblastici che induce successivamente anche l'attivazione osteoclastica tramite il sistema RANK-RANKL.

Vi è quindi un meccanismo di attivazione a cascata che porta alla formazione degli osteoclasti dai precursori osteoclastici e che vede come elemento chiave il sistema RANK-RANKL e l'iniziale attivazione degli osteoblasti ad opera della vitamina D.

L'effetto attivatorio della vitamina D sugli osteoclasti ha quindi la finalità di mantenere l'omeostasi calcica prelevando calcio dallo scheletro attraverso l'azione degli osteoclasti in caso di necessità (7).

RUOLO DELLA VITAMINA D SUL SISTEMA IMMUNITARIO

Negli ultimi anni è emersa l'importanza della vitamina D nella regolazione del sistema immunitario.

L'enzima 1-alfaidrossilasi non è presente esclusivamente a livello renale, ma anche nei macrofagi attivati e nelle cellule dendritiche (8,9).

In queste cellule, tuttavia, l'enzima risponde ad un sistema di regolazione differente. Mentre a livello renale la sua attività è inibita dal paratormone e dalla vitamina D, nelle cellule dendritiche e macrofagiche tale effetto inibitorio non è dimostrato.

La vitamina D, pertanto, non riveste un ruolo importante soltanto nella regolazione del metabolismo osseo e fosfo-calcico, ma è in grado di interferire anche con alcune funzioni del sistema immunitario.

Si sono dimostrate interazioni fra vitamina D e linfociti B e T. La vitamina D è coinvolta nella soppressione della produzione delle immunoglobuline e della proliferazione e differenziazione dei linfociti B (10).

I linfociti T CD4⁺ esprimono in condizioni di quiescenza i VDRs a basse concentrazioni, mentre in fase di attivazione tale espressione diviene molto più significativa (11).

Si è osservata un'importante inibizione della proliferazione dei T linfociti in presenza di 1,25(OH)₂D₃ ed in particolare dei Th1 oltre che un'inibizione della produzione di citochine (12).

La presenza di 1,25(OH)₂D₃ riduce la secrezione di interleuchina (IL)-2 e interferone (INF)- γ ad opera dei linfociti T CD4⁺ e stimola la produzione di IL-5 e IL-10 che a loro volta interferiscono ulteriormente sull'attività delle cellule T (13).

L'effetto inibitorio dell'1,25(OH)₂D₃ sulla IL-4 è abbastanza controverso (14,15), mentre risulta chiara l'inibizione dell'espressione di IL-6, che notoriamente è un importante fattore ad azione stimolante sulle cellule Th17, le quali rivestono un ruolo chiave nella risposta autoimmune.

Per quanto concerne il ruolo della vitamina D nella regolazione dell'attività delle cellule macrofagiche, essa promuove la differenziazione dei monociti in macrofagi e controlla il release delle citochine flogogene e delle chemochine da parte di queste cellule.

Al contrario, in caso di riduzione della concentrazione di vitamina D si riduce significativamente la maturazione dei macrofagi,

la loro capacità a produrre gli antigeni specifici di superficie, gli enzimi lisosomiali e a secernere il perossido di idrogeno.

L'aggiunta di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ recupera immediatamente l'espressione degli antigeni specifici di superficie nei macrofagi e la produzione di enzimi lisosomiali.

Vi sono anche altre funzioni importanti dell' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: la stimolazione della prostaglandina E_2 (citochina ad azione inibente); l'inibizione del granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) e la riduzione dell'attività di presentazione dell'antigene ai linfociti da parte dei macrofagi, riducendo l'espressione delle molecole MHC II sulla superficie cellulare (16, 17).

Benché sia stata dimostrata un'interferenza dell' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con le cellule dendritiche, non vi sono chiari effetti inibitori così come osservati per i macrofagi (18).

Sia nelle cellule dendritiche che nei macrofagi vi è l'enzima 1-alfaidrossilasi identico a quello presente nelle cellule renali; tale enzima a livello renale è controllato essenzialmente dalla calcemia e dal metabolismo osseo, mentre nelle cellule macrofagiche sarebbe sotto il controllo di segnali immunologici come ad esempio l' $\text{INF-}\gamma$ (19).

Gli studi effettuati sembrano quindi indicare che la vitamina D sia in grado di interferire con tappe importanti della risposta immunitaria ed in particolare avere un ruolo chiave nei processi di inibizione e di regolazione del sistema immunitario.

Vi sono peraltro alcune evidenze cliniche che incoraggiano nello studio dell'applicazione nella pratica terapeutica quotidiana di questa vitamina al fine di influenzare alcune malattie a patogenesi autoimmune (20,21,22).

Infatti, vi sono dati che tendono a dimostrare che la carenza di vitamina D possa aumentare la prevalenza di alcune malattie autoimmunitarie, mentre studi epidemiologici e studi condotti su modelli animali hanno messo in relazione la carenza di vitamina D alla predisposizione a malattie autoimmunitarie, quali la sclerosi multipla, il diabete mellito insulino-dipendente, l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso sistemico e le malattie infiammatorie intestinali (23).

Inoltre, alcuni modelli animali di malattie autoimmuni hanno mostrato un miglioramento delle manifestazioni cliniche a seguito di somministrazione di vitamina D (24).

In considerazione della sua attività immunosoppressiva, gli effetti della vitamina D sono stati indagati in molti modelli sperimentali di malattie autoimmunitarie.

Ad esempio, nel modello murino MRL-lpr/lpr di lupus, le supplementazioni di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hanno determinato una maggiore longevità, una riduzione della proteinuria e dell'artrite, e prevenuto la comparsa di lesioni cutanee (25,26).

La somministrazione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ prima della comparsa dei sintomi può addirittura prevenire la comparsa del lupus in questi modelli sperimentali (25).

Nel modello murino di artrite indotta dal collagene, gli agonisti del recettore della vitamina D sono capaci di prevenire l'espressione della malattia o eliminare i sintomi qualora la malattia sia già manifesta (25,27).

Nei modelli murini di encefalo-mielite, la somministrazione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ si è dimostrata capace di prevenire lo sviluppo della malattia, specialmente se associata ad altri immunosoppressori (28).

Al di là dei modelli sperimentali, esistono diversi studi che evidenziano un ruolo che la carenza di vitamina D potrebbe avere nelle malattie autoimmuni e più in particolare reumatiche.

Tuttavia, esistono diverse difficoltà nello stabilire una solida relazione tra carenza di vitamina D e malattie autoimmuni.

Nei diversi studi sono stati, infatti, spesso utilizzati differenti cut-off per considerare il deficit e l'insufficienza di vitamina D ed inoltre, alcuni studi tengono in considerazione l'introito di vitamina D piuttosto che i livelli sierici di quest'ultima.

Bisogna anche considerare la presenza di molti fattori di confondimento associati con questa malattia, come l'utilizzo di corticosteroidi e la fotosensibilità.

L'ipotesi che la carenza di vitamina D sia legata a una malattia autoimmune era già nota da tempo a seguito dell'osservazione che le popolazioni che vivono alle latitudini vicine all'equatore hanno un minore rischio di sviluppare malattie autoimmuni (29).

Inoltre, diverse fonti avevano indicato la presenza di ridotti livelli di vitamina D in pazienti affetti da malattie reumatiche, come uno studio del 2007 su 1029 pazienti con differenti malattie autoimmuni, come sclerodermia, polimiosite, dermatomiosite, sindrome da anticorpi antifosfolipidi, artrite reumatoide e lupus eritematoso sistemico, che ha mostrato la presenza di valori di 25(OH)D₃ più bassi che nei controlli (30).

Nell'artrite reumatoide è stata notata che la prevalenza della malattia aumenta proporzionalmente con il diminuire della latitudine e ciò coincide anche con aree geografiche dove la carenza di vitamina D è più prevalente (27,31,32).

Nell'artrite reumatoide, la carenza di vitamina D è stata anche messa in relazione con l'attività di malattia (32,33).

Inoltre, maggiori introiti di vitamina D sono risultati essere correlati ad una diminuzione del rischio di sviluppare artrite reumatoide in uno studio di coorte prospettico con 19368 donne (34).

Anche nel lupus eritematoso sistemico, ci sono evidenze di un frequente riscontro di bassi livelli di vitamina.

In 37 pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico i livelli di 25(OH)D₃ trovati erano 80 nmol/L (32 ng/ml) nel 65% dei casi, 47.7 nmol/L (19 ng/ml) nel 20% dei casi (32).

Simili risultati sono stati trovati in altri studi (35, 36). A seguito di questi frequenti riscontri di ipovitaminosi D, è stata anche inizialmente ipotizzata la presenza di anticorpi diretti contro la vitamina D, anche se uno studio su 171 pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico ha mostrato la presenza di anticorpi anti-vitamina D solo nel 4% dei pazienti, la cui concentrazione non era correlata ai livelli di vitamina D (37).

Controversi sono i dati che riguardano la correlazione tra carenza di vitamina D e attività di malattia nel lupus eritematoso sistemico (35, 38, 39, 40, 41).

Uno studio recente ha tuttavia evidenziato che le concentrazioni di vitamina D sono inversamente proporzionali all'attività di malattia in un ampio campione di pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico (42).

Anche nella sindrome di Behçet vi sono evidenze di un maggiore riscontro di bassi livelli di vitamina D nei pazienti affetti (43).

In un recente studio hanno riscontrato in 125 pazienti di sesso femminile affetti da connettivite mista, livelli di vitamina D più bassi rispetto ai controlli e indirettamente proporzionali ai livelli sierici di IL-6, IL-10, IL-23 e di alcuni marcatori solubili delle cellule endoteliali come l'endotelina e la trombomodulina (44).

In questo studio bassi livelli di vitamina D erano associati con gli spessori della tonaca intima e media delle carotidi, al fibrinogeno, al colesterolo totale e ai livelli di ApoA1.

Inoltre, in questi pazienti i bassi livelli di vitamina D mostravano una correlazione inversa con il coinvolgimento cardiovascolare.

Un aumento del rischio cardiovascolare associato a bassi livelli di vitamina D è stato riscontrato anche in pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico (45).

ARTRITE REUMATOIDE E VITAMINA D

L'artrite reumatoide (AR) è una patologia autoimmune articolare ad eziologia sconosciuta, la cui prevalenza è sorprendentemente costante in tutto il mondo a prescindere dalla localizzazione geografica e razza anche se ci sono alcune eccezioni, per esempio è leggermente inferiore in Cina (0,3%), più alta nel Nord America (5%), allo stesso modo sembra essere più comune nel Nord Europa rispetto al Sud (46).

Essa è caratterizzata da un processo infiammatorio a carico della sinovia delle articolazioni diartrodiali, con progressiva distruzione delle componenti cartilaginee e ossee.

Tale processo infiammatorio è sostenuto da linfociti di tipo Th1, che provocano l'attivazione e la proliferazione delle cellule endoteliali e sinoviali, il reclutamento e l'attivazione delle cellule infiammatorie, la secrezione di citochine e proteasi da parte dei macrofagi e delle cellule sinoviali fibroblasto-simili e la produzione di autoanticorpi.

È noto che la carenza di vitamina D si associa ad un aggravamento della risposta immunitaria Th1 ed il suo possibile ruolo nella patogenesi dell'AR si basa proprio su prove che mostrano una

aumentata espressione di VDR su macrofagi, condrociti e cellule sinoviali delle articolazioni dei pazienti (47).

Anche se l'eziologia della malattia rimane sconosciuta, una serie di studi hanno suggerito che ci sono una serie di fattori responsabili tra cui fattori ambientali e genetici.

È chiaro che sia i fattori genetici che ambientali colpiscono la prevalenza delle malattie autoimmuni.

Tuttavia il fatto che la vitamina D è stata implicata in diverse malattie autoimmuni suggerisce che essa potrebbe essere uno dei fattori ambientali che come altri normalmente partecipa al controllo della tolleranza del self (48).

La scoperta del recettore della vitamina D (VDR) nelle cellule del sistema immune ed il fatto che le cellule dendritiche attivate producono l'ormone vitamina D suggerisce che la stessa vitamina D potrebbe avere proprietà immuno-regolatorie.

Inoltre bassi valori di vitamina D potrebbero essere correlati alla prolungata mancata esposizione solare, predisposizione genetica, fattori nutrizionali e possono spiegare la prevalenza delle malattie autoimmuni correlate alla latitudine come l'AR con il riferimento al potenziale ruolo immunomodulante della vitamina D.

I livelli di vitamina D nel plasma sono stati trovati essere inversamente correlati con l'attività di malattia mostrando un ritmo circadiano, per esempio più severi in inverno (46).

È stato interessante notare che la somministrazione di vitamina D ha mostrato di inibire effettivamente l'autoimmunità anche se modelli animali presentavano sufficiente vitamina D.

È ormai comunque da tempo discusso il ruolo della carenza di vitamina D nella patogenesi dell'AR e la sua correlazione con l'attività di malattia.

La vitamina D ed i suoi analoghi hanno dimostrato la loro capacità di sopprimere la proliferazione delle cellule T ed inibire l'espressione di citochine pro-infiammatorie coinvolte nella patogenesi dell'AR come l'interleuchina 2 (IL-2) ed interferon-gamma (IF γ).

La vitamina D interferisce con diversi aspetti delle risposte immuni responsabili della patogenesi dell'AR, tra cui le risposte cellulari all'IL-1 β ed al TNF- α , l'espressione dell'IL-1 β ed IL-6, la differenziazione di Th 17 e cellule B e l'espressione di proteasi così come la matrice metalloproteasica MMP-1 e MMP-2 (49).

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo studio è la valutazione dello status vitaminico D e il potenziale effetto immunomodulante della vitamina D in pazienti affetti da artrite reumatoide (AR). In particolare in una casistica di pazienti affetti da AR è stata valutata in vivo la prevalenza di ipovitaminosi D ed è stata analizzata la correlazione tra i livelli circolanti di 25(OH)vitamina D con l'attività della malattia e con lo stato funzionale e la qualità della vita.

Al fine di analizzare i potenziali effetti immunomodulanti della vitamina D, sono stati valutati gli effetti della 1,25(OH)vitamina D₃ sull'espressione e la sintesi delle principali citochine implicate nella patogenesi dell'AR (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and RANKL) in colture primarie di monocito-macrofagi isolati dal sangue periferico di pazienti affetti da AR.

PAZIENTI E METODI

Valutazione dei livelli circolanti di vitamina D in pazienti affetti da AR e correlazione con attività di malattia, stato funzionale e qualità della vita

Sono stati reclutati 30 pazienti consecutivi rispondenti ai criteri diagnostici ACR/EULAR 2010 per AR (26 femmine e 4 maschi, età media $47,43 \pm 3,27$, range 41-52).

Il solo criterio di inclusione era rappresentato dalla diagnosi di AR e di un'età inferiore a 75 anni, indipendentemente dallo status menopausale. Il gruppo di controllo era costituito da 27 soggetti sani, comparabili per età e sesso (24 femmine e 3 maschi, età media $46,07 \pm 3,40$, range 40-52).

Tutti i pazienti reclutati sono stati sottoposti ad esame fisico ed anamnesi al fine della raccolta dei dati relativi alla malattia ed alla storia farmacologica.

Le variabili cliniche valutate includevano esordio e durata della malattia, presenza di manifestazioni extra-articolari, conta standardizzata di 28 articolazioni tumefatte (swollen joint count – SJC28), conta standardizzata di 28 articolazioni dolenti (tender joint count – TJC28), al fine del calcolo del Disease Activity Score

(DAS28), calcolato utilizzando la PCR secondo la seguente formula (formula di Nijmegen):
$$\text{DAS28} = (0.56 \cdot \sqrt{\text{TJC28}} + 0.28 \cdot \sqrt{\text{SJC28}} + 0.36 \cdot \ln(\text{CRP}+1)) \cdot 1.10 + 1.15.$$

In base alle linee guida internazionali una elevata attività di malattia è definita con valore di $\text{DAS } 28 > 5,1$; moderata attività con valori di $3,2 \leq \text{DAS } 28 \leq 5,1$ e bassa attività $\text{DAS } 28 \leq 3,2$.

I parametri clinici di danno funzionale correlato alla malattia sono stati valutati utilizzando il questionario HAQ Health Assessment Questionnaire Disability Index; lo stato generale di salute è stato calcolato utilizzando la scala analogica visiva (VAS 0-100).

Sono stati raccolti i dati relativi ai trattamenti specifici per AR effettuati dai pazienti reclutati, comprendenti corticosteroidi, DMARDs (methotrexate, ciclosporina, sulfasalazina, antimalarici) e farmaci biotecnologici (anti $\text{TNF}\alpha$, anti IL-6, anti CD20).

Nessuno dei soggetti reclutati aveva assunto terapia integrativa con vitamina D nè altri farmaci in grado di interferire con il metabolismo osseo (fatta eccezione per i glucocorticoidi), nei 3 mesi precedenti l'arruolamento.

Nel gruppo dei pazienti e nel gruppo di controllo sono stati dosati: calcio, fosforo, paratormone (PTH), fosfatasi alcalina (ALP),

VES e PCR ed i livelli sierici di 25(OH)vitamina D₃ (25(OH)D₃), metabolita circolante della vitamina D ed indicatore della riserva vitaminica, nel periodo tra Marzo e Settembre.

Nei due gruppi è stata misurata la densità minerale ossea (DMO) mediante l'esecuzione di densitometria ossea a doppia emissione di raggi x (DEXA) a livello della colonna e femore sinistro; per ogni paziente è stato inoltre calcolato il body mass index (BMI o indice di massa corporea), ottenuto dal rapporto del peso espresso in Kg e l'altezza espressa in m al quadrato.

Tutti i soggetti reclutati hanno firmato il consenso informato per la partecipazione allo studio.

Per analizzare i dati nei due gruppi sono stati applicati il test parametrico t Student ed il coefficiente di correlazione di Pearson. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0,05$.

Risultati

Le caratteristiche demografiche e cliniche dei gruppi sono mostrate nella **tabella 1**.

Il gruppo dei pazienti e il gruppo controllo dei soggetti sani erano comparabili per età e sesso. L'età media era di $47,43 \pm 3,27$ nei pazienti con AR (range 41-52) e di $46,07 \pm 3,40$ nei controlli sani (range 40-52). Non ci sono state differenze tra i due gruppi per quanto riguarda il sesso, età, BMI e la BMD.

Tutti i pazienti erano in trattamento con basse dosi di steroide (massimo dosaggio 7,5 mg di equivalente prednisonico) e farmaci di fondo classici (DMARDs: methotrexate, ciclosporina, sulfasalazina, antimalarici) e farmaci biotecnologici (anti TNF α , anti IL-6, anti CD20) (**tabella 2**).

In base ai livelli di attività di malattia, misurati con il DAS28, i pazienti affetti da AR sono stati suddivisi in 3 gruppi. Gruppo 1: bassa attività di malattia (gruppo 1, n=6); Gruppo 2: moderata attività di malattia (gruppo 2, n=17): gruppo 3: alta attività di malattia (gruppo 3, n=7) (**tabella 3**).

La media dei livelli sierici di 25(OH)D₃ nei pazienti con AR ($26,69 \pm 9,61$ nmol/l) era significativamente più bassa rispetto a quella dei soggetti sani di controllo ($33 \pm 4,92$ nmol/l) ($p < 0.003$) (**Fig.1**).

Analizzando i livelli circolanti di 25(OH)D₃ nei pazienti affetti da AR in base al livello di attività di malattia, è emerso quanto segue:

Gruppo 1 (bassa attività di malattia): 25(OH)D₃ 35,80nmol/l

Gruppo 2 (moderata attività di malattia): 25(OH)D₃ 26,28nmol/l

Gruppo 3 (elevata attività di malattia): 25(OH)D₃ 17,23nmol/l nmol/l.

La differenza dei livelli circolanti di 25(OH)D₃ tra i 3 gruppi era statisticamente significativa ($p < 0.05$ gruppo 1 vs gruppo 2; $p < 0.01$ gruppo 1 vs gruppo 3; $p < 0.05$ gruppo 2 vs gruppo 3)(**fig.2**).

I livelli circolanti di 25(OH)D₃ correlavano significativamente in maniera inversa sia con l'indice di attività di malattia (DAS28) che con l'indice di disabilità funzionale (HAQ) (rispettivamente $r = -0,653$ e $r = -0,50$ ($p < 0.05$)) (**fig.3 e4**).

Valutazione degli effetti immunomodulanti della vitamina D in monocito-macrofagi del sangue periferico derivanti da pazienti affetti da AR

Sono stati reclutati 17 pazienti rispondenti ai criteri diagnostici ACR/EULAR 2010 per AR (4 maschi, 13 femmine), età media $53,64 \pm 6,61$, range 44-65). Nessuno di tali pazienti era in trattamento con farmaci biotecnologici, in particolare con anti TNF e anti IL-6.

La durata della malattia dei pazienti arruolati era > 1 anno e tutti i pazienti presentavano una moderata attività di malattia ($3,2 < \text{DAS 28} < 5,1$).

Come gruppo di controllo sono stati reclutati 15 soggetti sani di età e sesso comparabili con il gruppo dei pazienti con AR (3 maschi, 12 femmine) con età media $53,93 \pm 7,21$, range 42-62.

Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti con AR e controllo sono mostrate nella **tabella 4**.

Nessuno dei soggetti inclusi nello studio aveva assunto vitamina D nei 3 mesi precedenti l'arruolamento.

Tutti i soggetti (gruppo AR e gruppo controllo) donatori hanno dato il loro consenso informato a partecipare allo studio.

Isolamento dei monociti e differenziazione dei macrofagi

I monocito-macrofagi dei pazienti e del gruppo di controllo (soggetti sani) sono stati ottenuti da monociti isolati da campioni di sangue intero eparinato raccolto con prelievo venoso periferico.

Le cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC), costituite da linfociti e monociti, sono state separate dagli eritrociti mediante centrifugazione in gradiente di densità su Ficoll (PAA; Austria).

Dopo lavaggio, i macrofagi sono stati purificati dalle PBMC mediante selezione positiva con biglie magnetiche anti-CD 14, secondo protocollo indicato dal produttore (Miltenyi Biotec) e sono stati risospesi in terreno di coltura (2×10^6 cellule/pozzo) costituito da RPMI 1640 (Sigma) integrato con antibiotici (penicillina 100 IU/ml e streptomina 100 mg/ml; PAA; Austria) e 10 % di siero fetale di vitello (FCS; PAA; Austria) ed incubata a 37 ° C al 5% di CO₂.

Dopo 24 ore, i terreni di coltura e le cellule non aderenti, costituite da linfociti, sono stati rimossi e le cellule aderenti incubate con terreno completo (RPMI, 10 % FCS, penicillina e streptomina) per 14 giorni. I terreni sono stati sostituiti al 50% ogni 2 giorni.

Le cellule erano > 95 % CD14+, come determinato dall'analisi FACS (dati non mostrati) prima della coltura.

Stimolazione dei macrofagi

Il quindicesimo giorno, i terreni sono stati rimossi e le cellule sono state lavate con tampone fosfato salino (PBS; PAA; Austria) e poi esposte ad un 1 µg/ml di lipopolisaccaride (LPS; Sigma, St. Louis, MO, USA) per 6 ore.

Le cellule poi sono state trattate con concentrazioni crescenti (10^{-10} - 10^{-7} M) con la forma attiva della vitamina D - 1,25 (OH)₂D₃ (Roche) per 48 ore.

Al termine dell'esposizione alla 1,25(OH)₂D₃, le cellule sono state usate per effettuare differenti dosaggi previsti dallo studio. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato per ogni campione.

Le cellule non trattate sono state utilizzate come colture di controllo.

Espressione di mRNA e sintesi proteica del recettore della vitamina

D

L'RNA totale è stato isolato dalle cellule trattate e non, usando mini kit di isolamento RNA RNeasy (Qiagen, Hilden), secondo le raccomandazioni del produttore per le cellule in coltura.

Per generare il cDNA template da utilizzare per la PCR real time, 1 µg dell'RNA totale è stato utilizzato per la reazione di trascrizione inversa con il Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche, Mannheim).

La Real time PCR (qPCR) è stata effettuata con il sistema Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System. Un totale di 20 µL di reattante è stato ottenuto con TaqMan Universal PCR Master Mix, VDR TaqMan Gene Expression Assay (Hs00172113_ml; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), il template di cDNA (1 µl) e acqua senza RNase.

Il Ct (valori di ciclo soglia di fluorescenza) è stato automaticamente dato dal software SDS 2.1 (Applied Biosystems), i livelli di espressione relativa di VDR mRNA sono stati calcolati usando il metodo comparativo $\Delta\Delta C_t$ dopo normalizzazione con gene

endogeno β -actina (Hs99999903_ml; Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Il valore quantitativo relativo è stato espresso come $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

I livelli totali della proteina VDR sono stati valutati su lisato cellulare mediante analisi immunoenzimatica specifica (Cusabio; China).

Le concentrazioni della proteina VDR sono state calcolate in base alla curva standard ed i risultati espressi come pg/mg proteine intracellulari.

Valutazione della sintesi di TNF- α , IL-1 α , IL- β , IL-6

Dopo l'esposizione all'1,25(OH) $_2$ D $_3$, i sovranatanti delle colture cellulari sono stati raccolti e conservati a - 80 °C. I livelli di TNF- α (Thermo Scientific), IL-1 α , IL- β , IL-6 (R&D System, Minneapolis, MN) e RANKL (Biovendor) sono stati determinati usando la tecnica immunoenzimatica (ELISA), con kits commerciali, secondo le istruzioni del produttore.

Le concentrazioni di citochine campioni sono state ottenute dai valori di interpolazione e di assorbanza della curva standard, ottenute per ciascuna citochina analizzata e sono state normalizzate per ml di proteine intracellulari.

Il contenuto proteico di ciascun pozzetto è stato determinato mediante il metodo Bradford (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA).

I livelli di TNF- α : test di inibizione

Per gli esperimenti di inibizione, le cellule sono state pre-incubate per 30 minuti a 37°C in presenza di anticorpi monoclonali leganti il recettore della vitamina D (diluiti a 1:100; Millipore) poi sono state trattate con 1,25(OH)₂D₃, come descritto precedentemente.

La specificità dell'effetto della 1,25(OH)₂D₃ è stata valutata mediante un test di controllo negativo, sostituendo lo specifico anticorpo primario anti VDR con immunoglobulina non immune dello stesso isotipo (R&D System, Minneapolis, MN, USA).

Dopo l'esposizione alla 1,25(OH)₂D₃, i livelli del TNF- α nei terreni di coltura sono stati rilevati mediante ELISA con il kit commerciale (Thermo Scientific), secondo le istruzioni dei produttori.

I risultati sono stati espressi come pg/mL e normalizzati per mg/ml proteine intracellulari.

Espressione di TNF- α : immunistoichimica

Per la colorazione immunistoichimica del TNF α , le cellule sono state piastrate su vetrini Labtek Chamber (Nunc, Wiesbaden, Germany), trattate con concentrazioni crescenti (10^{-10} - 10^{-7} M) di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ per 48 ore e poi fissate con paraformaldeide al 4 % a 4 °C per 20 minuti.

Il blocco dell'attività della perossidasi endogena e del legame non specifico è stato ottenuto mediante incubazione con Perox Abolish (BioCare, USA) ed albumina di siero bovino 1% (Sigma, St. Louis, MO, USA) rispettivamente.

Le cellule sono state poi incubate con lo specifico anticorpo primario monoclonale umano TNF- α /TNFSFIA (R&D System, Minneapolis, MN, USA) per 45 minuti.

L'immunocolorazione è stata effettuata utilizzando un anticorpo biotinilato secondario e seguita da incubazione con streptavidina-perossidasi (Goat-on-Rodent HRP-Polymer, Biocare, USA).

Aggiungendo diaminobenzidina come substrato è stata sviluppata la reazione di perossidasi. I nuclei cellulari sono stati colorati, per contrasto con ematossilina.

Misurazione dell'ossido nitrico

I livelli di ossido nitrico nei sovrantanti delle colture di macrofagi trattati sono stati rilevati con metodo colorimetrico Griess.

150 μ l di reattivo Griess (Sigma) è stato aggiunto ad un volume uguale del campione in piastre da 96 pozzetti e dopo 15 minuti, l'assorbanza è stata letta a 540 nm e confrontata con le curve di assorbanza di diluizioni seriali di nitrato di sodio in terreni di coltura completi.

Analisi statistica

I dati sono stati ottenuti da esperimenti condotti in triplicato ed espressi come media \pm deviazione standard (SD). Il test parametrico t di Student ed il test ANOVA sono stati applicati per valutare le differenze di trattamento dei gruppi. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0.05$.

Risultati

Effetto della 1,25 (OH)₂D₃ sull'espressione m-RNA VDR e livelli di proteine

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative dell'espressione di mRNA VDR tra cellule derivanti da soggetti sani e cellule derivanti da soggetti con AR.

La stimolazione con elevate concentrazioni di 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁸ e 10⁻⁷) induceva un aumento significativo dell'espressione di mRNA VDR e della sintesi proteica VDR, sia nelle cellule con AR che nelle cellule provenienti da soggetti sani ($p < 0.05$) (**Fig. 5A e 5B**).

Effetto della vitamina D sulla produzione di citochine proinfiammatorie

I livelli di TNF- α sono stati rilevati nei sovranatanti di cellule di soggetti sani e di soggetti con AR dopo il trattamento con 1,25 (OH)₂D₃ e confrontate a quelle di cellule non trattate (controlli).

I macrofagi provenienti da soggetti con AR presentavano una produzione significativamente maggiore di TNF- α rispetto ai macrofagi provenienti da soggetti sani ($p < 0.01$).

Il trattamento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ riduceva i livelli di TNF- α in tutte le popolazioni cellulari studiate (AR e soggetti sani).

Infatti nei macrofagi AR trattati con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ la produzione di TNF- α era significativamente inferiore rispetto alle cellule non trattate.

La riduzione della produzione di TNF- α indotta dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è stata osservata con tutte le concentrazioni utilizzate della stessa; infatti anche alle concentrazioni più basse la riduzione dei livelli di TNF- α era significativa ($p < 0.01$).

Nei macrofagi derivanti da soggetti sani, a differenza dei macrofagi derivanti dai soggetti con AR, i livelli di TNF- α risultavano significativamente ridotti solo quando venivano utilizzate alte concentrazioni di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-8} e 10^{-7}M) ($p < 0,05$); in tali cellule, le concentrazioni più basse di vitamina D (10^{-9} e 10^{-10}M) non producevano effetti apprezzabili (**Fig. 6A**) sulla sintesi di anti TNF- α .

La pre-incubazione delle cellule con un anticorpo monoclonale neutralizzante il recettore della vitamina D determinava la scomparsa degli effetti sulla sintesi di TNF- α indotti dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Nella **Figura 7 A** sono mostrati i livelli di TNF- α nelle colture di macrofagi normali e AR trattati con concentrazioni variabili di

vitamina D, in presenza di un anticorpo neutralizzante il VDR (**fig. 7A**) e in presenza di un anticorpo non specifico (**fig. 7B**)($p<0.05$).

In condizioni basali (in assenza di $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$), la produzione di IL-1 α , IL-1 β e IL6 era significativamente maggiore nei macrofagi derivanti da soggetti affetti da AR rispetto ai macrofagi derivanti da soggetti sani.

La sintesi dell'IL-1 α , IL-1 β e IL-6 risultava essere significativamente ridotta nelle colture trattate con concentrazioni più alte di $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ (sia nelle cellule AR, che nelle cellule di soggetti sani) ($p<0.005$).

In tutte le popolazioni cellulari esaminate, non sono state osservate differenze significative nelle cellule trattate con $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 10^{-10} e 10^{-9}M , rispetto alle cellule non trattate.

È interessante notare che, sia i macrofagi derivanti da soggetti con AR che i macrofagi normali presentavano simili livelli di IL-1 α , IL-1 β e IL-6 quando trattati con concentrazioni maggiori di $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-7}M).

La **figura 6B-D** mostra i livelli di IL-1 α , IL-1 β e IL-6 in macrofagi monociti derivati normali e con AR trattati con concentrazioni crescenti di $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$.

Effetto della vitamina D sull'espressione del TNF- α

L'effetto della 1,25(OH)₂D₃ sull'espressione di TNF- α è stato valutato anche mediante analisi immunocitochimica.

L'immunocolorazione diffusa per il TNF- α era presente a livello della membrana della maggioranza delle cellule non trattate.

Dopo trattamento con 1,25 (OH)₂D₃ per 48 h, l'intensità della colorazione si presentava ridotta e questo effetto è stato osservato sia nelle cellule normali e che in quelle AR.

La **Figura 8** mostra l'effetto di diverse concentrazioni di 1,25 (OH)₂D₃ sull'espressione del TNF- α nei macrofagi derivati da pazienti sani e da pazienti con AR.

Effetto della vitamina D sulla produzione di citochina pro-osteoclastogenica

I macrofagi derivanti da soggetti affetti da AR presentavano una sintesi significativamente maggiore della citochina osteoclastogenetica RANKL rispetto ai macrofagi di soggetti sani.

Il trattamento con 1,25(OH)₂D₃ di macrofagi derivanti da soggetti con AR induceva una significativa riduzione della produzione RANKL rispetto alle cellule non trattate ($p < 0.05$).

L'effetto massimo è stato osservato quando le cellule sono state trattate con le più alte concentrazioni di vitamina D (10^{-8} e 10^{-7} M) suggerendo un possibile un effetto dose-dipendente ($p < 0.01$).

La produzione di RANKL dalle cellule controllo risultava essere significativamente ridotta in seguito a trattamento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ solo a concentrazioni più elevate (10^{-8} e 10^{-7}).

La **Figura 9** mostra l'effetto di diverse concentrazioni di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulla sintesi del RANKL nei macrofagi monociti-derivati di pazienti sani e con AR.

Effetto della vitamina D sulla produzione di ossido nitrico

La sintesi di NO è stata determinata dalla reazione di Griess sul sovranatante delle colture cellulari.

Come mostrato in **Fig. 10**, il trattamento di colture di macrofagi AR e normali con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induceva una riduzione della produzione di NO.

I macrofagi di pazienti affetti da AR trattati con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ presentavano una riduzione significativa nella produzione di NO rispetto alle cellule non trattate, con tutte le concentrazioni di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ utilizzate; anche con concentrazioni più basse la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

(OH)₂D₃ determinava una riduzione drastica della produzione di NO ($p < 0.01$). Al contrario, nelle cellule derivanti da soggetti sani la riduzione della produzione di NO è stata osservata solo in presenza di concentrazioni più elevate (10^{-8} - 10^{-7} M) di 1,25(OH)₂D₃.

DISCUSSIONE

Sebbene le prime osservazioni che hanno mostrato una correlazione tra la vitamina D ed il sistema immunitario sono state segnalate nei primi anni '80, solo gli emergenti dati epidemiologici degli ultimi anni hanno evidenziato la crescente prevalenza dell'insufficienza della vitamina D e la correlazione tra lo stato della vitamina D e l'incidenza di malattie autoimmuni.

Tutto ciò ha spostato l'attenzione degli studiosi sull'azione immunologica della vitamina D.

La prima patologia autoimmune ad essere studiata è stata la sclerosi multipla. Da allora è stato dimostrato il ruolo anti-infiammatorio ed immunomodulante della vitamina D in una vasta gamma di malattie autoimmuni, tra cui il diabete mellito, le malattie infiammatorie croniche intestinali, il lupus eritematoso sistemico e l'AR.

Nei pazienti affetti da AR è spesso presente una riduzione dei livelli sierici di 25(OH)D, analogamente a quanto osservato in altre malattie autoimmuni (in particolare il lupus eritematoso sistemico e le connettiviti indifferenziate)(33).

Nella AR, una riduzione dei livelli di vitamina D è spesso riscontrata in differenti aree geografiche che includono non solo i paesi del nord Europa, per via del minore irraggiamento solare dovuto alla latitudine (21).

Diversi studi hanno dimostrato una significativa correlazione negativa tra i livelli sierici di vitamina D e la severità dell'AR (50), suggerendo che la vitamina D abbia un effetto modulante sul corso della malattia.

Tuttavia ci sono alcuni studi che mostrano delle incertezze sulla correlazione tra deficit di vitamina D e attività di malattia probabilmente legate alle piccole dimensioni dei campioni presi in esame (51).

Nel nostro studio, concordemente a quanto visto in letteratura, sono risultati significativamente ridotti rispetto ai soggetti sani, i livelli di vitamina D nei pazienti affetti da AR.

Un altro dato che appare interessante è che esiste non solo una correlazione tra l'attività di malattia ed i livelli di vitamina D, ma anche una correlazione negativa tra i valori di vitamina D ed il DAS 28 e HAQ.

Il deficit di vitamina D nei pazienti affetti da AR è probabilmente multifattoriale.

È presumibile che i pazienti con AR ad alta attività di malattia, quindi ridotta capacità fisica che può portare ad uno stile di vita sedentario, non si espongono facilmente ai raggi ultravioletti con conseguente riduzione dei livelli di vitamina D.

In aggiunta, ci potrebbe essere un malassorbimento della quota di vitamina D introdotta con gli alimenti.

Spesso questi pazienti assumono vari farmaci che impediscono l'assorbimento della vitamina D, come corticosteroidi o antiepilettici utilizzati per il dolore neuropatico ed altri.

I nostri risultati appaiono essere un'ulteriore prova a conferma dell'importanza del ruolo della vitamina D sul sistema immunitario ed in particolare nell'influenzare la comparsa ed eventualmente l'evoluzione delle malattie autoimmunitarie.

Tuttavia, bisogna sottolineare che anche il nostro studio, così come i precedenti, presenta alcuni limiti quali la ridotta numerosità dei campioni in esame e la presenza di diversi fattori di confondimento che potrebbero provocare una distorsione nei risultati, quali dieta, esposizione solare, età, indice di massa corporea e l'assunzione di farmaci.

Analogamente a quanto descritto sono stati mostrati anche gli effetti immunomodulanti e modificanti la malattia della vitamina D o dei suoi analoghi in modelli murini con artrite.

Ad oggi, il ruolo fisiopatologico della vitamina D nell'AR resta da chiarire. Diversi studi hanno concentrato la loro attenzione sull'influenza della vitamina D nei fibroblasti sinoviali dell'AR e cellule dell'immunità adattativa, ma molto meno si sa per quanto riguarda gli effetti della vitamina D nelle cellule dell'immunità innata (48).

In questo studio è stato valutato l'effetto di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nei macrofagi isolati dal sangue periferico derivati da monociti di pazienti affetti da AR.

Il trattamento dei macrofagi AR con concentrazioni crescenti di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, con range tra 10^{-10} a 10^{-7} M ha indotto una significativa diminuzione dose-dipendente della sintesi proteica della forma solubile del $\text{TNF-}\alpha$, una nota molecola chiave per le risposte nella infiammazione precoce. La pre-incubazione delle cellule con un anticorpo monoclonale neutralizzante il recettore della vitamina D ha determinato la scomparsa degli effetti sulla sintesi di $\text{TNF-}\alpha$ indotti dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Bloccando l'effetto della vitamina D non c'è più la significativa riduzione.

È interessante notare che è stata osservata una riduzione significativa nelle cellule normali solo dopo il trattamento con concentrazioni più elevate perché fa capire che nelle malattie autoimmunitarie l'effetto immunomodulante della vitamina D si esprime già a concentrazioni più basse. Pertanto ciò sottolinea l'importanza della supplementazione della vitamina D.

Il TNF- α è una citochina pleiotropica, che coordina la risposta infiammatoria attraverso l'induzione di altre citochine quali IL-1 e IL-6, con il reclutamento di cellule infiammatorie e immuni e con la up-regolazione delle molecole di adesione.

Il TNF- α rappresenta anche il principale obiettivo terapeutico per l'AR: i farmaci anti-TNF- α , che consistono di anticorpi e proteine di fusione neutralizzanti il TNF α , hanno dimostrato di migliorare le manifestazioni cliniche, ridurre il danno articolare e la progressione radiografica ed indurre remissioni (52).

Esistono evidenze non solo che riguardano la forma solubile del TNF- α , ma anche la sua forma di precursore, trans-membrana TNF- α , che si lega ai recettori del TNF e media gli effetti proinfiammatori e proartritici.

Il TNF- α trans-membrana è stato dimostrato di essere capace di indurre l'artrite con iperplasia e infiammazione sinoviale in topi transgenici solo esprimendo TNF- α legato alla membrana (53).

L'analisi immunohistochimica ha mostrato una immunocolorazione diffusa per il TNF- α a livello della membrana della maggioranza delle cellule non trattate. Dopo trattamento con 1,25(OH) $_2$ D $_3$ l'intensità della colorazione si è ridotta in tutte le popolazioni cellulari (cellule normali e quelle con AR).

È interessante notare che i macrofagi AR sono stati più sensibili al trattamento con vitamina D rispetto alle cellule normali, anche se non sono state osservate differenze significative dell'espressione di mRNA VDR. Il trattamento con elevate concentrazioni di Vitamina D induceva un aumento significativo dell'espressione di mRNA VDR e della sintesi proteica sia nelle cellule con AR che in quelle provenienti da soggetti sani.

Diversamente dal TNF- α , la sintesi di IL-1 α , IL-1 β e IL-6 risulta essere significativamente ridotta dal trattamento dell'1,25(OH) $_2$ D $_3$ solo a concentrazioni elevate di 10 $^{-8}$ e 10 $^{-7}$ M in tutte le popolazioni cellulari.

Questa diversa modulazione potrebbe dipendere dal fatto che la sintesi delle interleuchine è regolata da una varietà di fattori che i

macrofagi producono, come IL-15, fattore inibitorio della migrazione di macrofagi, ossido nitrico, TGF- β (54).

Inoltre, la diversa influenza della vitamina D sulla produzione di citochine dai macrofagi potrebbe essere correlata ad una rete complessa di percorsi che regolano l'espressione genica di citochine ed alle vie di segnalazione intracellulare coinvolte dalla vitamina D.

È stato recentemente dimostrato che la vitamina D media gli effetti anti-infiammatori negli attivati monociti- macrofagi regolando la proteina chinasi 1 mitogeno-attivata (MAPK-1), la regolazione fondamentale della produzione di citochine, tra cui TNF- α , IL-1 e IL6 (55).

Tuttavia, la produzione di IL-6 nei macrofagi attivati, a differenza del TNF- α , è anche positivamente regolata da due distinti domini Src omologhi contenenti tirosina fosfatasi-1 (SHP-1) (56-57).

È stata precedentemente dimostrata l'inibizione dose-dipendente di tutte le citochine testate nei macrofagi attivati dalla stimolazione con lipopolisaccaride. Il lipopolisaccaride è il componente principale della membrana esterna dei batteri Gram-negativi, considerato il più potente attivatore della risposta secretoria dei macrofagi (55).

Il motivo di questi dati variabili può dipendere non solo dalle differenze cellulari, ma anche dalla durata del trattamento e dalla concentrazione di farmaco utilizzato.

Oltre al TNF- α , IL-1 e IL-6, un altro mediatore pro infiammatorio prodotto dai macrofagi dell'AR è NO, un noto radicale libero implicato nelle lesioni del tessuto citotossico in una varietà di malattie e la cui sovrapproduzione è stata collegata alla disfunzione dei linfociti caratteristica dell'AR (58).

Abbiamo dimostrato che l'1,25(OH) $_2$ D $_3$ ha ridotto significativamente i livelli di NO in terreni di coltura a qualsiasi livello di concentrazione utilizzata.

È stato dimostrato che l'NO dei macrofagi AR induce le cellule sinoviali a produrre il TNF- α , favorendo l'infiammazione e la distruzione ossea, e la produzione di NO è a sua volta stimolata dal TNF- α .

Così, la diminuzione della produzione di NO osservata nelle cellule trattate potrebbe anche essere indotta dalla riduzione del TNF- α .

Parallelamente alla ridotta sintesi di citochine pro-infiammatorie, è stata osservata una forte inibizione nella produzione del RANKL da parte dei macrofagi AR.

Il RANKL, membro della superfamiglia del TNF, esiste come forma legata alla membrana e come forma solubile ed è un componente del complesso fattore controllo trimolecolare (OPG / RANK / RANKL) (59).

Il RANKL si lega al recettore RANK sulla superficie degli osteoclasti e dei suoi precursori sia sugli osteoclasti maturi, con conseguente differenziazione ed attivazione degli osteoclasti; al contrario il legame al recettore esca osteoprotegerina (OPG) inibisce il riassorbimento osseo osteoclastico.

L'espressione del RANKL è stata documentata dai siti di erosioni ossee di AR attiva oltre che nelle cellule multinucleate che esprimono i marcatori osteoclastici, dimostrando che l'erosione ossea, il segno distintivo dell'AR, è il risultato del riassorbimento osseo osteoclastico nei siti di sinovite.

Inoltre, un topo con artrite carente di RANKL, ottenuto utilizzando un trasferimento di siero artritogenico, ha sviluppato un'inflammatione simile a quella osservata nei topi controllo, ma il grado di erosione ossea è risultato drasticamente ridotto.

Allo stesso modo, bloccando il RANKL nell'artrite indotta da adiuvante, nell'artrite TNF-mediata e artrite collagene-indotta di modelli sperimentali, anche se non è inibita l'infiammazione, si assiste ad una diminuzione di erosioni ossee (60).

Abbiamo scoperto che i livelli di RANKL nel terreno di cellule con AR trattate si sono ridotti a qualsiasi livello di concentrazioni utilizzate, rispetto a quelle non trattate.

È interessante notare, che il trattamento con la vitamina D ha ridotto la produzione del RANKL nei macrofagi sani e con AR con una IC50 di 172 e 58.71nM, rispettivamente, suggerendo che l'effetto inibente è più potente in condizioni patologiche.

In condizioni fisiologiche, al fine di regolare i livelli di calcio, la vitamina D aumenta l'efficienza dell'assorbimento di calcio intestinale ed ottimizza l'attività delle cellule ossee, regolando l'attività metabolica degli osteoblasti e la differenziazione e il riassorbimento degli osteoclasti.

Un certo numero di studi ha riferito che la vitamina D ha significativamente aumentato i livelli del RANKL nei normali osteoblasti primari umani e murini suggerendo il suo potenziale ruolo osteoclastogenico, che, in condizioni patologiche è caratterizzato da

eccessivo riassorbimento osseo, e che la sua azione era di sopprimere la formazione e l'attività degli osteoclasti (61).

Tenendo conto della capacità del TNF- α di indurre l'osteoclastogenesi in vitro, e di attivare gli osteoclasti attraverso un'azione diretta indipendente dal RANKL, abbiamo ipotizzato che la vitamina D potrebbe indirettamente ridurre l'osteoclastogenesi dell'AR e conseguentemente l'erosione ossea, anche attraverso la sottoregolazione della sintesi del TNF- α (62).

Di notevole, abbiamo osservato l'effetto molto più potente della vitamina D sulla inibizione del TNF- α : i valori di IC50 nei macrofagi normali e con AR erano 73,35 e 2 nM rispettivamente.

In linea con questi dati, è stato recentemente descritto il diverso impatto dell' 1,25(OH)₂D₃ a varie concentrazioni sulla produzione di RANKL e la secrezione di TNF- α nelle PBMC sane e con AR stimulate con anti-CD3 e anti-CD-28 (63).

I dati presentati in questo studio, anche se sono richiesti studi più completi ed esaustivi, hanno dimostrato l'attività immunomodulante della vitamina D in queste condizioni sperimentali e hanno sottolineato il suo potenziale ruolo inibitore nei mediatori di macrofagi periferici con AR, includendo la rete di citochine proinfiammatorie, NO e RANKL.

I nostri dati, unitamente a quelli precedentemente ottenuti nelle cellule sinoviali con AR e quelli ottenuti negli studi preclinici, sostengono ulteriormente l'interesse per la vitamina D e sollecitano ulteriori indagini per valutare il possibile impiego di questo secosteroide come intervento terapeutico nell'AR.

Tuttavia, tenendo conto degli effetti tossici di dosi sovra-fisiologiche della vitamina D, sarebbe meglio utilizzare gli analoghi strutturali che esercitano una attività immunoregolatoria simile senza causare ipercalcemia.

In conclusione, considerando l'influenza della vitamina D sul sistema immune, è ipotizzabile che la vitamina D possa essere usata nel trattamento delle malattie autoimmunitarie, al fine di ridurre l'incidenza e la severità (16).

FIGURE

Tabella 1

Caratteristiche	TOT.Pazienti n %	AR n %	CONTROLLI SANI n %	P
Tot pazienti	57 (100%)	30 (52,63%)	27 (47,36%)	-
Età alla diagnosi (media SD)	46,78±3,37	47,43 ± 3,27	46,07±3,40	-
Sesso femminile	50 (87,71 %)	26 (52 %)	24 (48 %)	-
Sesso maschile	7 (12,28 %)	4 (57,14 %)	3 (42,85 %)	-
BMI	24,96 ± 3,46	25,1± 3,41	24,81 ± 3,58	-
HAQ	-	1,19±0,81	-	-
DAS28	-	4,07 ±1,00	-	-
Calcemia (8,8-10,6 mg/dl)	8,94 ± 0,49	8,98± 0,48	8,89 ± 0,50	-
Fosforemia (2,7-4,5 mg/dl)	3,47 ± 0,47	3,35 ± 0,43	3,61 ± 0,49	-
25 (OH)VITAMINA D (nmol/L)	29,68 ± 8,32	26,69 ± 9,61	33±4,92	0,0034
PTH (10-65 pg/ml)	32,43 ± 12,77	36,81 ± 15,34	27,56 ± 6,50	0,0053
Fosfatasi (alcalina 42- 141 U/L)	74,64 ± 30,51	84,76± 32,89	63,40 ± 23,42	0,0071
VES	23,94 ± 8,17	24,86 ± 9,84	22,92 ± 5,80	-
PCR	0,65 ± 0,61	0,94 ± 0,70	0,32 ± 0,25	-
BMD totale colonna	1,038± 0,069	1,037 ± 0,067	1,040 ± 0,073	-
BMD femore sinistro	0,914 ± 0,138	0,947 ± 0,126	0,878 ± 0,145	-

Tabella 2

Pazienti con AR	Farmaco utilizzato	Durata terapia (anni)	Terapia cortisonica
6	Mtx (7,5-15 mg/sett) + Idrossiclorochina (200-400 mg/die)	6	Metilprednisolone 4 mg
2	Sulfasalazina (2-3 g/die)	2	Deltacortene 7,5 mg
6	Mtx (7,5-15 mg/sett)+ Ciclosporina (2,5-4 mg/Kg/die)	6	Metilprednisolone 4 mg
3	Tocilizumab 8 mg/kg ogni 4 sett (anti-IL-6)	3	Deltacortene 5 mg
2	Mtx (7,5-15 mg/sett)+ Mabthera 1000 mg al giorno 1 e giorno 15(anti-CD20)	2	Metilprednisolone 4mg
4	Mtx (7,5-15 mg/sett)+ Etanercept 50 mg/sett (anti-TNF- α)	3	Metilprednisolone 4 mg
3	Mtx (7,5-15 mg/sett)+ Certolizumab 200 mg ogni 15 gg (anti-TNF- α)	5	Deltacortene 5 mg
3	Mtx (7,5-15 mg/sett)+ Adalimumab 40 mg ogni 15gg (anti-TNF- α)	3	Metilprednisolone 4 mg
1	Mtx (7,5-15 mg/sett)+ Golimumab 50 mg/mese (anti-TNF- α)	2	Deltacortene 5 mg

Tabella 3

SOTTOGRUPPI	LIVELLI DI VITAMINA D (nmol/L)	VALORE P
Gruppo 1 attività malattia bassa (DAS 28 ≤3,2)	35,80 ± 10,46	0,0000
Gruppo 2 attività malattia moderata (3,2 ≤ DAS 28 ≤5,1)	26,28 ± 7,11	0,0000
Gruppo 3 attività malattia alta (DAS 28 >5,1)	17,23 ± 4,30	0,0001

Tabella 4

Caratteristiche	TOT.Pazienti n %	AR n %	CONTROLLI SANI n %
Tot pazienti	32 (100%)	17 (53,12%)	15 (46,87%)
Età alla diagnosi (media SD)	53,7± 6,89	53,6 ± 6,61	53,9 ± 7,21
Sesso maschile	7 (21,87%)	4 (57,14%)	3 (42,85%)
DAS28	-	4,08 ±0,59	-
Terapia cortisonica (dosaggio e durata)	-	9 Metilprednisolone (4 mg/die per 2 mesi) 1 Deltacortene (7,5 mg per 1 mese) 7 Deltacortene (5 mg/die per 1 mese)	-
DMARDS (dosaggio e durata)	-	6 Mtx (7,5-15mg/sett)+ Idrossiclorochina (200-400 mg/die) per 6 anni; 2 Sulfasalazina (2-3 g/die) per 2 anni; 6 Mtx (7,5-15 mg/sett) +Idrossiclorochina (200-400 mg/die) per 6 anni; 3 Mtx (7,5-15 mg/sett) per 3 anni	-

FIG.1

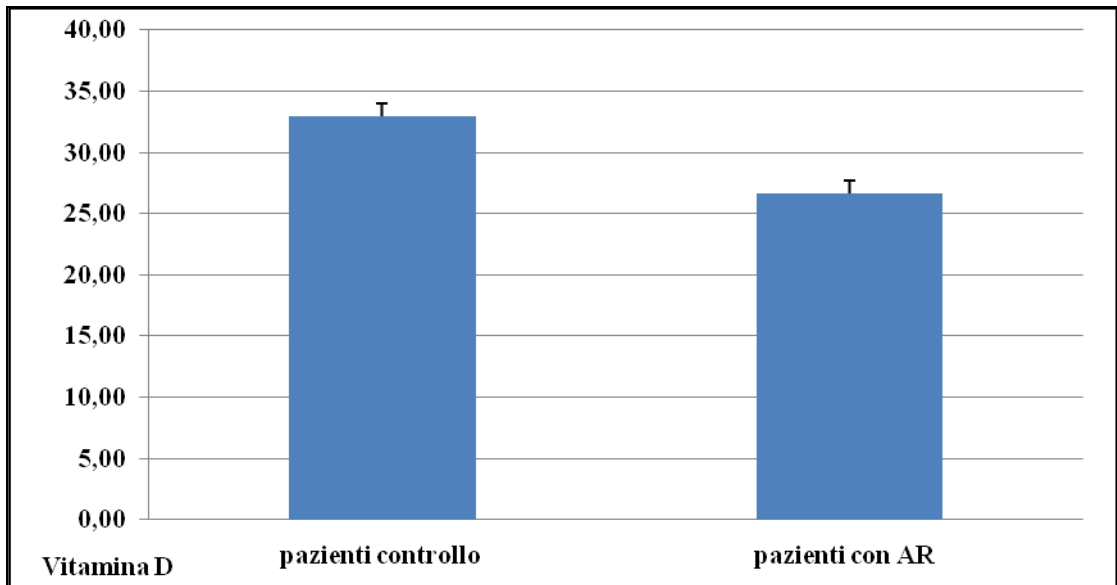


FIG.2

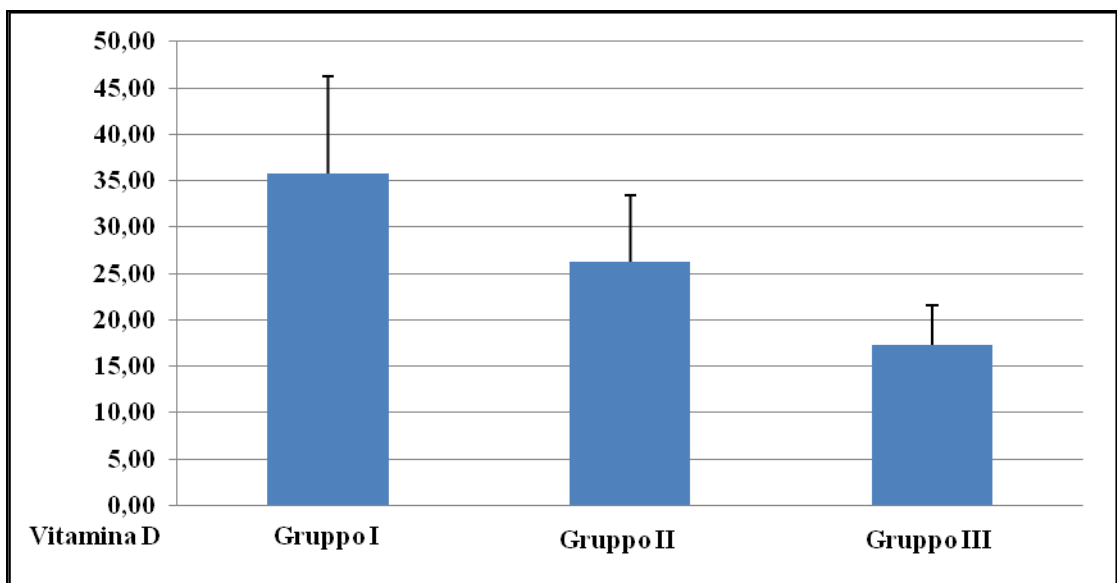


FIG.3

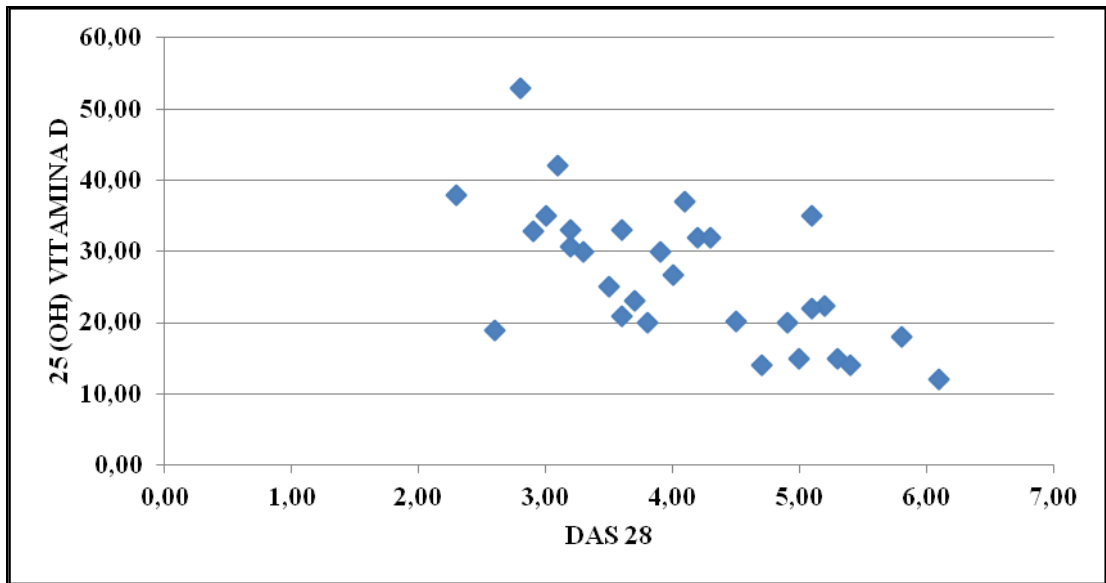


FIG.4

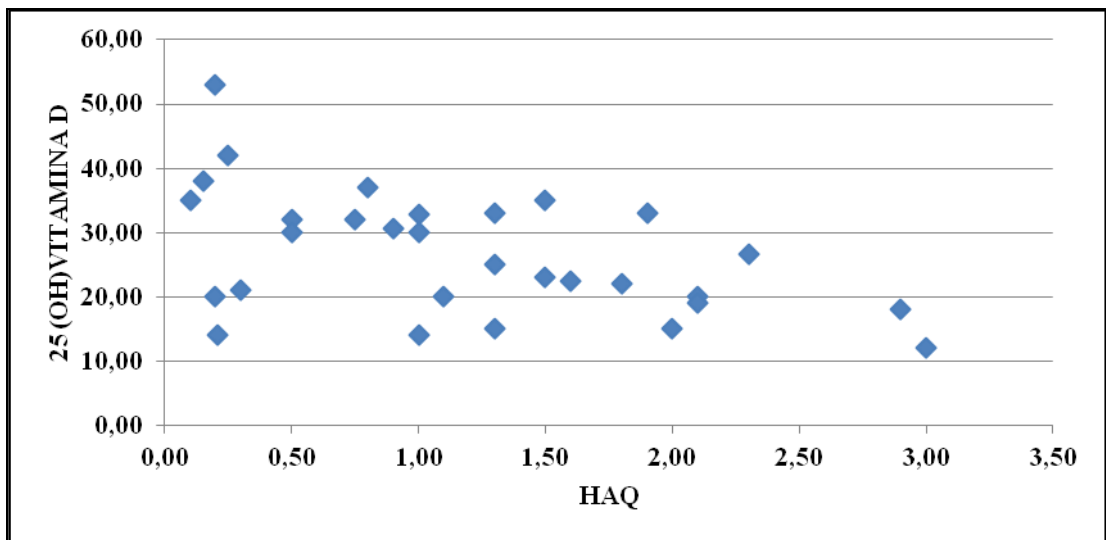


FIG.5 A

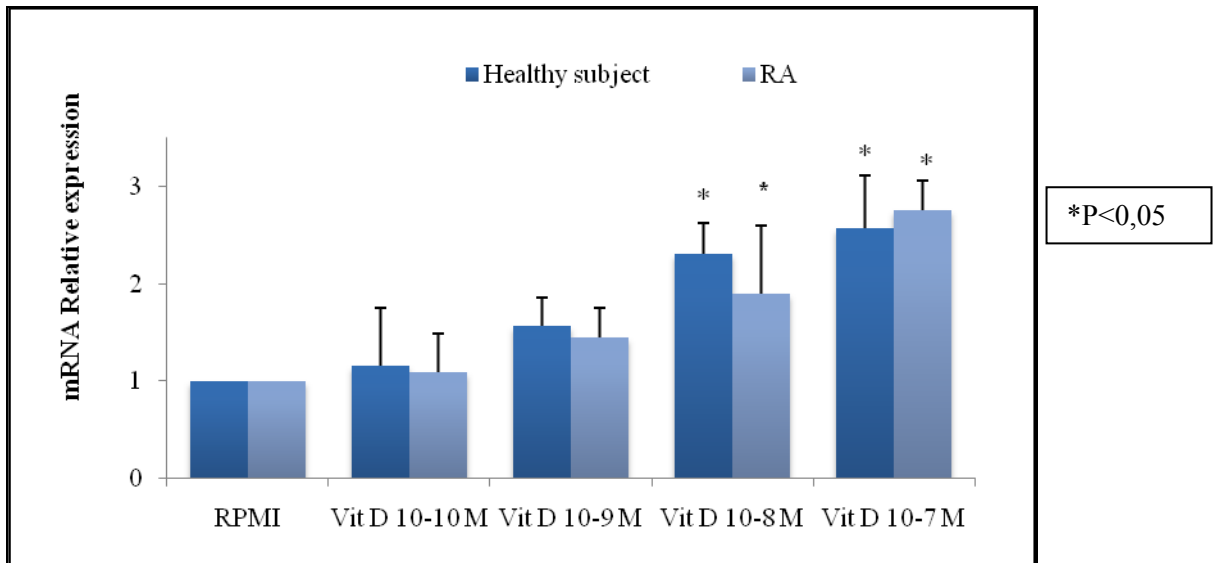


FIG. 5B

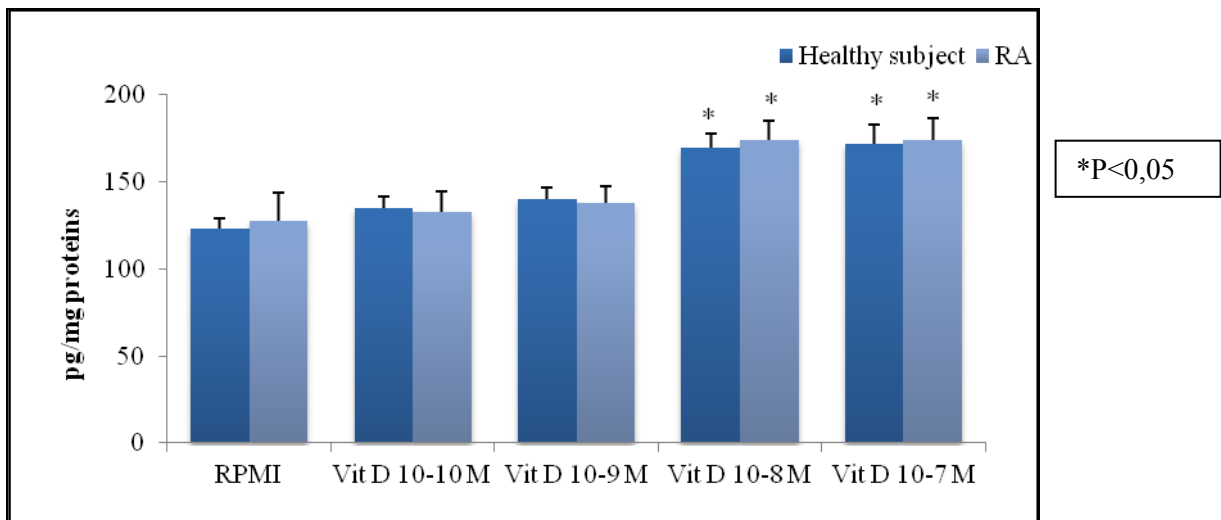


FIG.6A

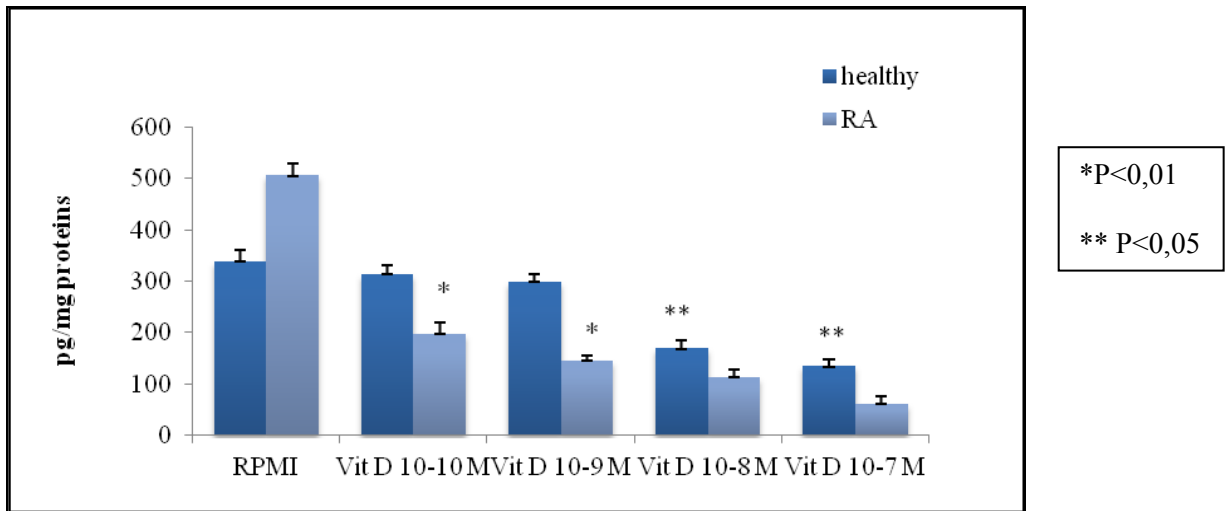


FIG.6 B

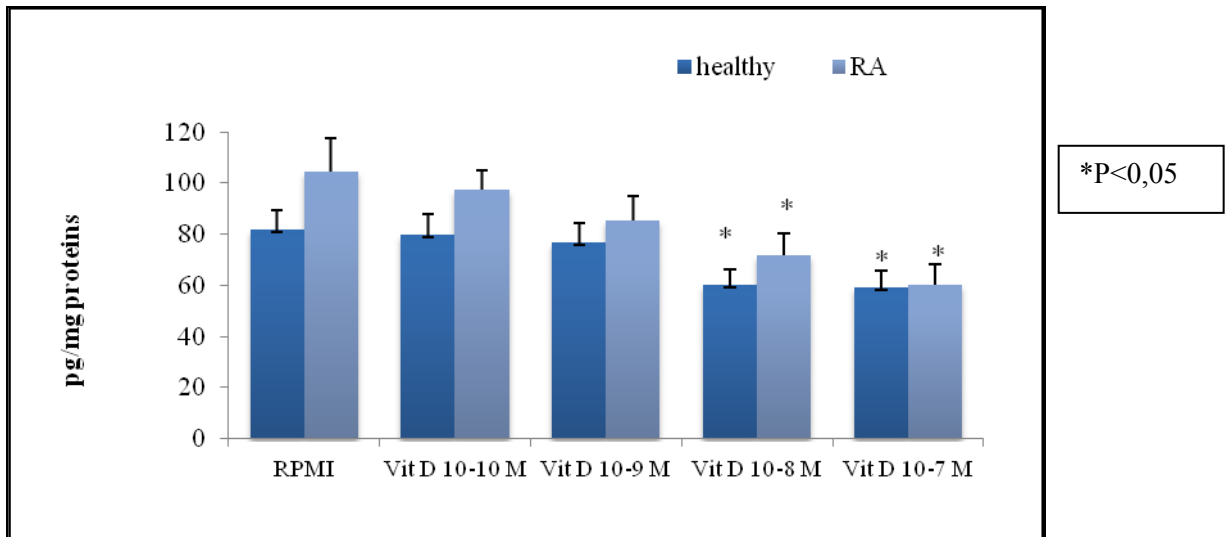


FIG.6C

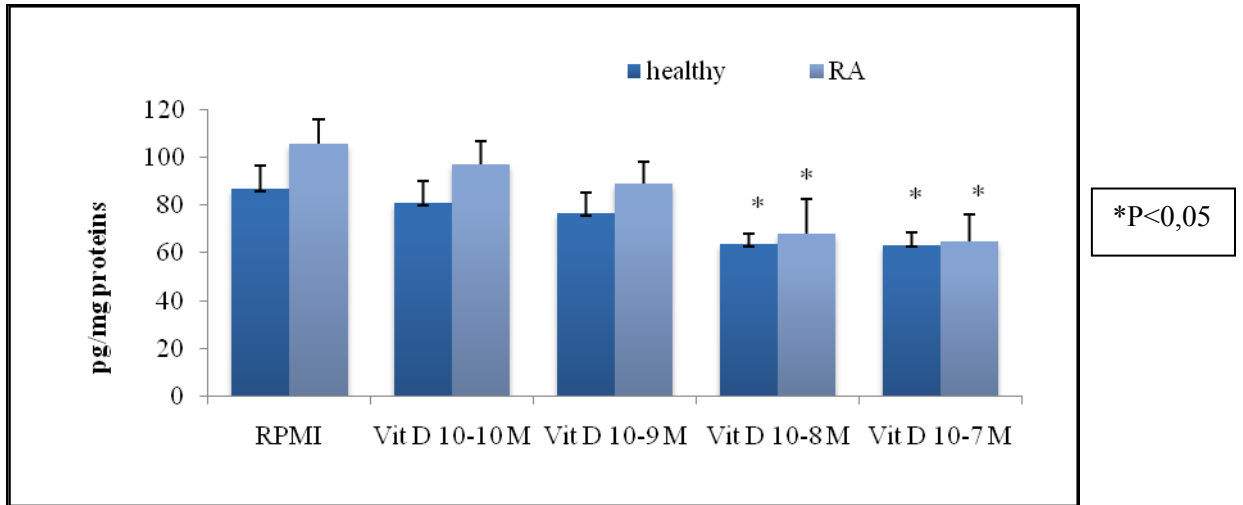


FIG.6D

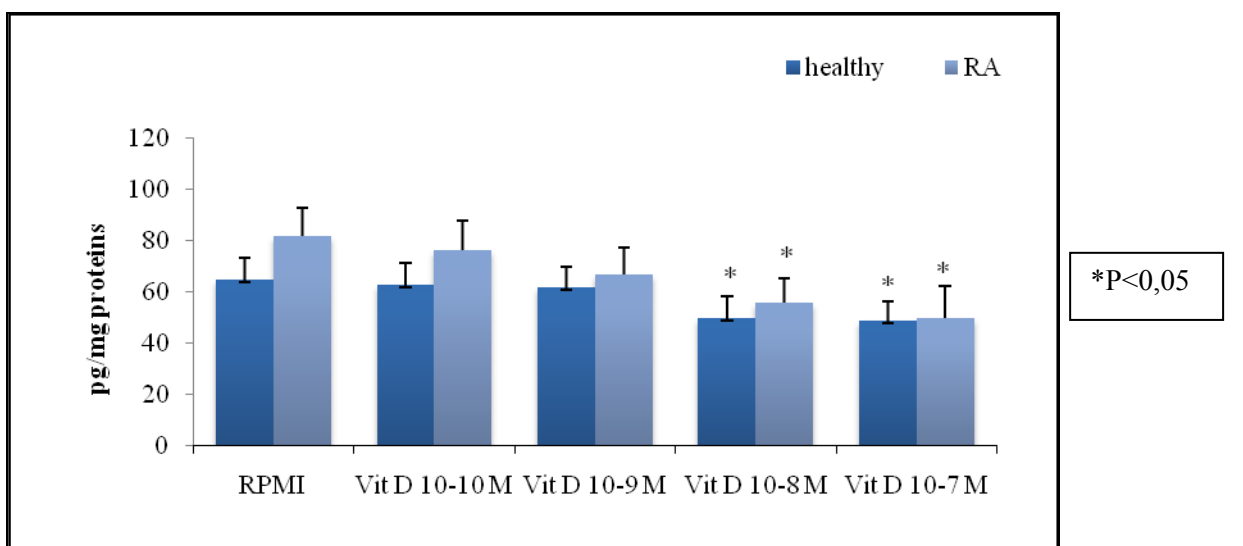


FIG.7 A

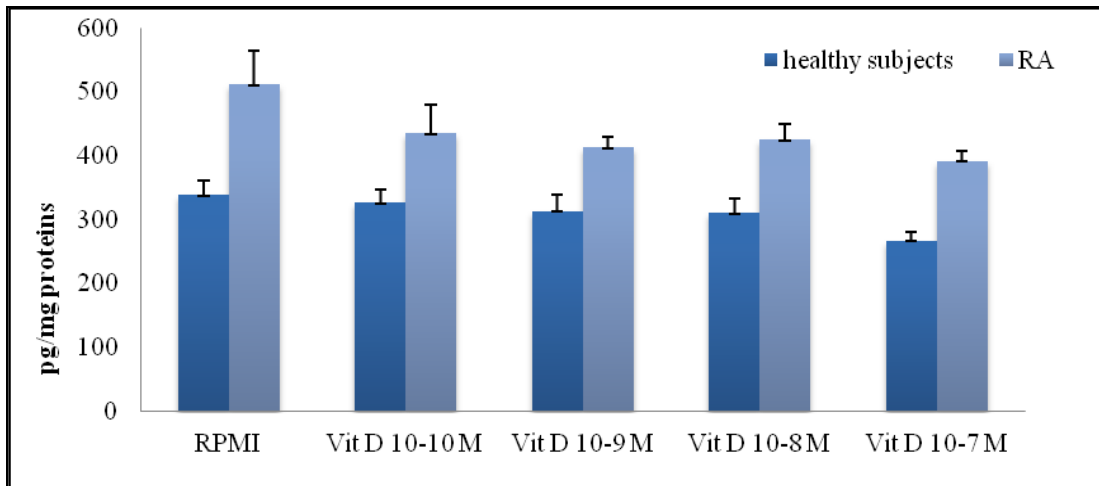


FIG.7 B

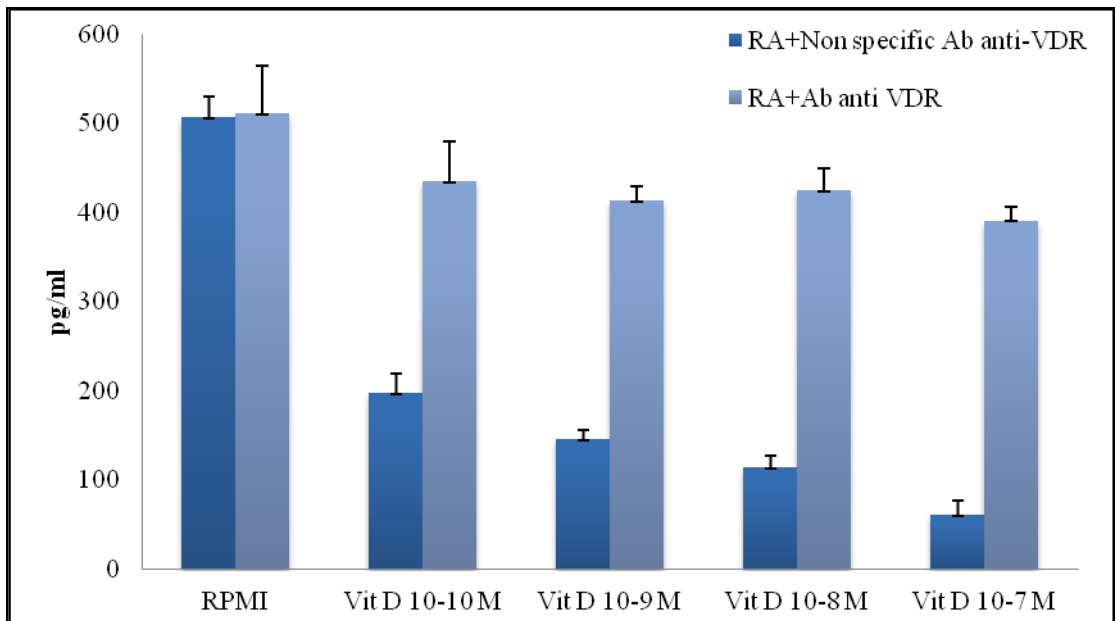


FIG.8

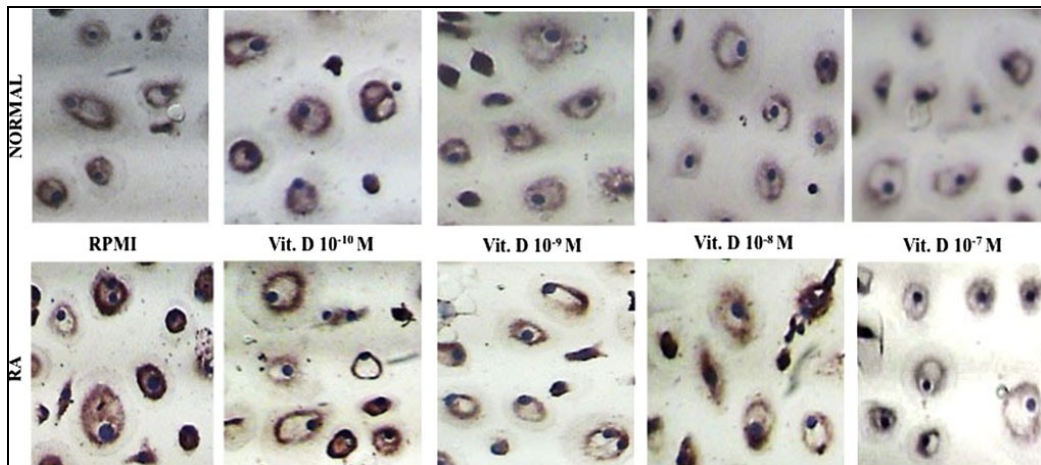


FIG.9

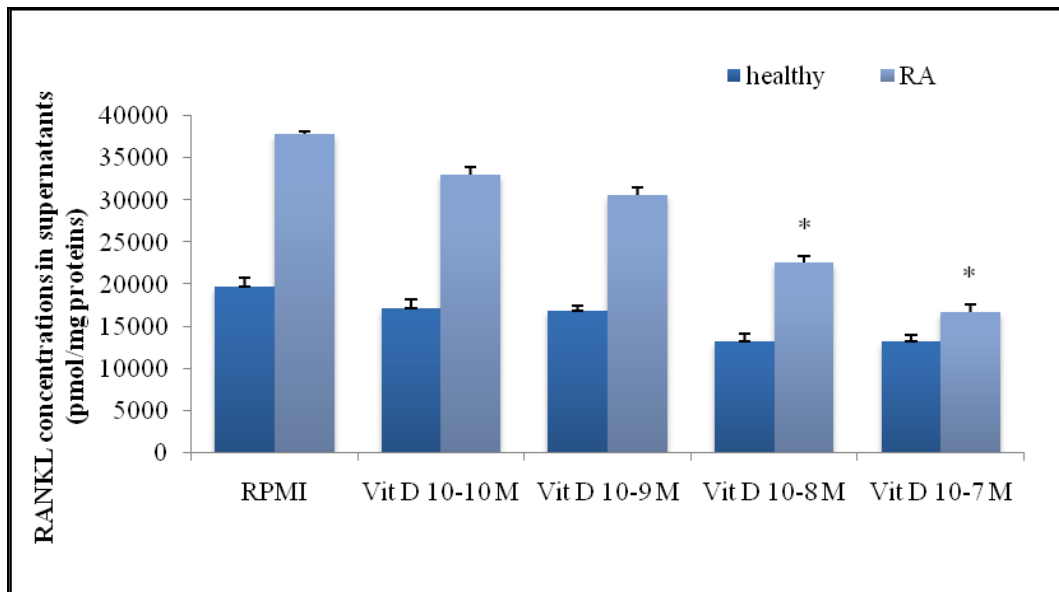
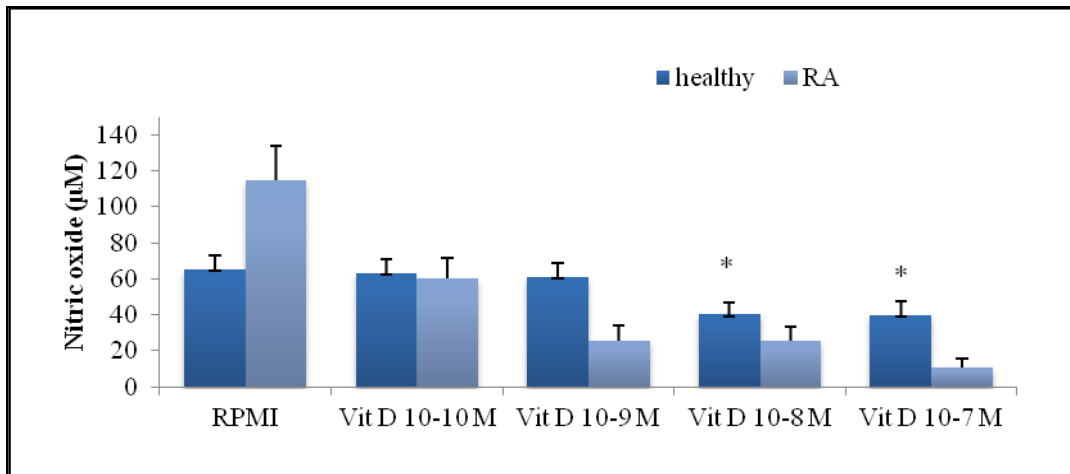


FIG.10



*P<0,01

BIBLIOGRAFIA

1. Heaney RP. The vitamin D requirement in health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 13-19.
2. Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br J Nutr* 2003; 89: 552-572.
3. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1678S-1688S.
4. Cannell JJ, Hollis BW, Zasloff M, Heaney RP. Diagnosis and treatment of vitamin D deficiency. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9: 107-118.
5. Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *N Engl J Med* 2011; 364: 248-254.
6. Adami S, Viapiana O, Gatti D, et al. Relationship between serum parathyroid hormone, vitamin D sufficiency, age, and calcium intake. *Bone* 2008; 42: 267-270.

7. Holick MF. Vitamin D: its role in cancer prevention and treatment. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92: 49-59.
8. Fritsche J, Mandal K, Ehrnsperger A, Andreesen R, Kreutz M. Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha, 25-hydroxyvitamin D₃ by human dendritic cells. *Blood* 2003; 102: 3314-3316.
9. Monkawa T, Yoshida T, Hayashi M, Saruta T. Identification of 25-hydroxyvitamin D₃ 1 alpha-hydroxylase gene expression in macrophages. *Kidney Int* 2000; 58: 559-68.
10. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation. *J Immunol* 2007; 179: 1634-1647.
11. Mahan BD, Wittke A, Weaver V, Cantorna MT. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem* 2003; 89: 922-932.
12. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ has a direct effect on naïve CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001; 167: 4974-4980.

13. Van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005; 97: 93-101.
14. Cantorna MT, Woodward WD, Hayes CE, De Luca HF. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF-beta 1 and IL-4. *J Immunol* 1998; 160: 5314-5319.
15. Staeva-Viera TP, Freedman LP. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2002; 168: 1181-1189.
16. Cantorna MT, Mahan BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med* 2004; 229: 1136-1142.
17. Lemire JM. Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Cell Biochem* 1992; 49: 26-31.
18. Griffin MD, Lutz W, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R. Dendritic cell modulation by 1 alpha, 25 dihydroxyvitamin D₃ and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that

- promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6800-6805.
19. Overbergh L, Dacallonne B, Valckx D, et al. Identification and immune regulation of 25-hydroxyvitamin D 1-alpha hydroxylase in murine macrophages. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 139-146.
 20. Kim SY, Suh HW, Chung JW, Yoon SR, Choi I. Diverse functions of VDUP1 in cell proliferation, differentiation, and diseases. *Cell Mol Immunol* 2007; 4: 345-51.
 21. Cutolo M, Otsa K, Uprus M, Paolino S, Seriola B. Vitamin D in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2007; 7: 59-64.
 22. Cutolo M, Otsa K. Review: vitamin D, immunity and lupus. *Lupus* 2008; 17: 6-10.
 23. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 2005; 26: 662-687.
 24. Szodoray P, Nakken B, Gaal J, et al. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scand J Immunol* 2008; 68: 261-269.
 25. Adorini L. Intervention in autoimmunity: the potential of vitamin D receptor agonists. *Cell Immunol* 2005; 233: 115-124.

26. Shoenfeld N, Amital H, Shoenfeld Y. The effect of melanism and vitamin D synthesis on the incidence of autoimmune disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2009; 5: 99-105.
27. Cantorna MT. Vitamin D and autoimmunity: is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence? *Proc Soc Exp Biol Med* 2000b; 223: 230-233.
28. Van Etten E, Branisteanu DD, Verstuyf A, Waer M, Bouillon R, Mathieu C. Analogs of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 as dose-reducing agents for classical immunosuppressants. *Transplantation* 2000; 69: 1932-1942.
29. Holick MF. Vitamin D: a millennium perspective. *J Cell Biochem* 2003; 88: 296-307.
30. Orbach H, Zandman-Goddard G, Amital H, Barak V, Szekanecz Z, Szucs G, et al. Novel biomarkers in autoimmune diseases: prolactin, ferritin, vitamin D, and TPA levels in autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1109: 385-400.
31. Cutolo M, Otsa K, Paolino S, Yprus M, Veldi T, Serio B. Vitamin D involvement in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosis. *Ann Rheum Dis* 2009a; 68: 446-447.

32. Cutolo M. Vitamin D and autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2009b; 48: 210-212.
33. Arnsen Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1137-1142.
34. Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 72-77.
35. Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Olivares N, Martinez-Berriotxo A, Aguirre C. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 920-923.
36. Kamen DL, Cooper GS, Bouali H, Shaftman SR, Hollis BW, Gilkeson GS. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2006; 5: 114-117.
37. Carvalho JF. Anti-vitamin D, vitamin D in SLE. *Ann N Y AcadSci* 2007; 1109: 550-557.

38. Muller K, Kriegbaum NJ, Baslund B, Sorensen OH, Thymann M, Bentzen K. Vitamin D3 metabolism in patients with rheumatic diseases: low serum levels of 25-hydroxyvitamin D3 in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 1995; 14: 397-400.
39. Becker A, Fischer R, Schneider M. Bone density and 25-OH vitamin D serum level in patients with systemic lupus erythematosus. *Z Rheumatol* 2001; 60: 352-358.
40. Costenbader KH, Feskanich D, Holmes M, Karlson EW, Benito-Garcia E. Vitamin D intake and risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in women. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 530-535.
41. Borba VZ, Vieira JG, Kasamatsu T, Radominski SC, Sato EI, Lazaretti-Castro M. Vitamin D deficiency in patients with active systemic lupus erythematosus. *Osteoporos Int* 2009; 20: 427-433.
42. Amital H, Szekanecz Z, Szucs G, Danko K, Nagy E, Csepany T, et al. Serum concentrations of 25-OH vitamin D in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are inversely related to

- disease activity: is it time to routinely supplement patients with SLE with vitamin D? *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1155–1157.
43. Do JE, Kwon SY, Park S, Lee ES. Effects of vitamin D on expression of Toll-like receptors of monocytes from patients with Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 840-848.
44. Hajas A, Sandor J, Csathy L, Csipo I, Barath S, Paragh G, et al. Vitamin D insufficiency in a large MCTD population. *Autoimmun Rev* 2011; 10(6): 317-324.
45. Wu PW, Rhew EY, Dyer AR, et al. 25-hydroxyvitamin D and cardiovascular risk factors in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009; 61:1387-1395.
46. Ayse Dicle Turhanoflu, Hayal Güler, Zafer Yönden, Fatma Aslan, Ayhan Mansuroglu, Cahit Ozer. The relationship between vitamin D and disease activity and functional health status in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2011;31:911–914.
47. Antonio Antico, Marilina Tampoia, Renato Tozzoli. Il ruolo della vitamina D nelle malattie autoimmune. *Ligand Assay* 2010;15:4.

48. Maurizio Cutolo, Kati Otsa, Maria Uprus, Sabrina Paolino, Bruno Seriola. Vitamin D in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews* 2007; 7: 59-64.
49. Aisha Yassin, Hala Gareeb, Nesrine A Mohamed , Caroline Samy. The Relationship between Vitamin D and Disease Activity in Egyptian Patients with Rheumatoid Arthritis. *International Trends in Immunity* 2014. Vol.2 n.3.
50. Haga HJ1, Schmedes A, Naderi Y, Moreno AM, Peen E. Severe deficiency of 25-hydroxy- vitaminD₃ (25-OH-D₃) is associated with high disease activity of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2013 May;32(5):629-33.
51. Sahebari M, Mirfeizi Z, Rezaieyazdi Z, Rafatpanah H, Goshyeshi L. 25(OH) vitaminD serum values and rheumatoid arthritis disease activity (DAS28 ESR). *Caspian J Intern Med.* 2014 Summer; 5(3):148-55.
52. Caporali R1, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Gorla R, Filippini M, Marchesoni A, Favalli EG, Bobbio-Pallavicini F, Montecucco C. Switching TNF-alpha antagonists in rheumatoid arthritis: the

- experience of the LORHEN registry. *Autoimmun Rev.* 2010 Apr; 9(6):465-9.
53. Georgopoulos S1, Plows D, Kollias G. Transmembrane TNF is sufficient to induce localized tissue toxicity and chronic inflammatory arthritis in transgenic mice. *J Inflamm.* 1996;46(2):86-97.
54. Kinne RW1, Bräuer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2(3):189-202.
55. Zhang Y1, Leung DY, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, Goleva E. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J Immunol.* 2012 Mar 1;188(5):2127-35.
56. Rego D1, Kumar A, Nilchi L, Wright K, Huang S, Kozlowski M. IL-6 production is positively regulated by two distinct Src homology domain 2-containing tyrosine phosphatase-1 (SHP-1)-dependent CCAAT/enhancer-binding protein β and NF- κ B pathways and an SHP-1-independent NF- κ B pathway in

- lipopolysaccharide-stimulated bone marrow-derived macrophages. *J Immunol.* 2011 May 1;186(9):5443-56.
57. Geng Y, Zhang B, Lotz M. Protein tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of cytokines in human blood monocytes. *J Immunol.* 1993 Dec 15;151(12):6692-700.
58. Nagy G1, Koncz A, Fernandez D, Perl A. Nitric oxide, mitochondrial hyperpolarization, and T cell activation. *Free Radic Biol Med.* 2007 Jun 1;42(11):1625-31.
59. Pettit AR, Walsh NC, Manning C, Goldring SR, Gravallesse EM. RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2006 Sep;45(9):1068-76.
60. Kong YY1, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.* 1999 Nov 18;402(6759):304-9.

61. Thomas GP1, Baker SU, Eisman JA, Gardiner EM. Changing RANKL/OPG mRNA expression in differentiating murine primary osteoblasts. *J Endocrinol.* 2001 Aug;170(2):451-60.
62. Fuller K1, Murphy C, Kirstein B, Fox SW, Chambers TJ. TNF alpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology.* 2002 Mar;143(3):1108-18.
63. Luo J1, Wen H, Guo H, Cai Q, Li S, Li X. 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits the RANKL pathway and impacts on the production of pathway-associated cytokines in early rheumatoid arthritis. *Biomed Res Int.* 2013;2013:101805. doi: 10.1155/2013/101805. Epub 2013 Apr 22.