



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

**YENİDOĞAN BEBEKLERDE KORDON KANINDA VİTAMİN D DÜZEYİNİN
DÜZENLEYİCİ T LENFOSİTLER ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. AYŞEGÜL GÜVEN

Ankara-2009



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

**YENİDOĞAN BEBEKLERDE KORDON KANINDA VİTAMİN D DÜZEYİNİN
DÜZENLEYİCİ T LENFOSİTLER ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. AYŞEGÜL GÜVEN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aylin Tarcan

Ankara-2009

TEŞEKKÜR

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tez danışmanım, bebeğimin doktoru Doç. Dr. Aylin Tarcan'a, asistanlık hayatım boyunca varlığını arkamda hep hissettiğim hocam Prof. Dr. Namık Özbek'e, vakaların toplanması sırasında renkli kişiliği ve heyecanı ile bana moral veren Uz. Dr. Aytül Tarcan'a, eğitimim boyunca katkılarını esirgemeyen tüm değerli hocalarıma, laboratuvar çalışmalarının yapılmasında destekleri nedeniyle Uz. Dr. İlknur Kozanoğlu, Ecz. Ayşegül Haberal ve Lab. Oktay Sözen'e, dostluklarını paylaştığım tüm asistan arkadaşlarıma, eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olup bana destek veren aileme, hayatıma değer katan eşim ve oğluma sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Güven Ayşegül, Yenidoğan Bebeklerde kordon kanında vitamin D düzeyinin düzenleyici T lenfositler üzerine etkisinin araştırılması, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, 2009

Vitamin D kalsiyum ve fosfat metabolizmasında önemli rol oynayan, kemiğin büyümesi ve devamlılığı için gerekli olan bir vitamindir. Son yıllarda yapılan çalışmalar vitamin D'nin kemik metabolizması dışındaki organların fonksiyonlarında da etkili olduğunu göstermiştir. Vitamin D'nin in vivo ve in vitro immün yanıt üzerine etkileri de bulunmuştur. Düzenleyici T hücreler (Regülatör T hücreler, Treg) efektör T hücrelerinin aktivasyonu düzenlerler. Böylece immün tolerans bozuklukları sonucu oluşabilecek otoimmün reaksiyonları engeller. Yenidoğanda ve erken bebeklikte görülebilen atopik egzema, inek sütü alerjisi gibi alerjik hastalıklarda ve mikroorganizmalara karşı inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde Treglerin önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Vitamin D, dendritik hücreleri, düzenleyici T hücrelerin immün toleransı sağlaması için uyarır; düzenleyici T hücrelerin, alerji, inflamatuvar yanıt ve otoimmünitenin kontrolündeki işlevini yapmasını sağlar. Bu çalışmada kord kanından ölçülen vitamin D düzeyinin bebeğin düzenleyici T hücreleri üzerine etkisini araştırmayı hedefledik. Çalışmaya gebelik haftası son adet tarihine göre 38 hafta ve üzerinde olan 101 bebek alındı. Kord kanından 25(OH)D düzeyi çalışıldı ve CD4, CD25 analizi yapıldı. Ağır vitamin D eksikliği olan [25(OH)D<12 ng/ml] ve 25(OH)D>12 ng/ml olan grup arasında, beyaz küre sayıları, total lenfosit yüzdesi, total lenfosit sayısı, T lenfosit yüzde ve sayısı, T helper yüzde ve sayısı, Treg yüzde ve sayısı açısından anlamlı fark gözlenmedi. Çalışmamızda vitamin D düzeyleri ile ölçülen ve hesaplanan T hücre subsetleri arasında anlamlı korelasyon da gösterilemedi.

Anahtar kelimeler: Vitamin D, düzenleyici T hücre, kord kanı, yenidoğan

ABSTRACT

Vitamin D plays a central role in calcium and phosphate homeostasis and its essential for the proper development and maintenance of bone. Recent studies show that vitamin D is effective for different tissue functions in addition to bone metabolism. Vitamin D has immunomodulatory capacities in vivo and in vitro. Regulatory T cells (Treg) regulate effector T cell functions in order to prevent the autoimmune reactions that can occur because of immune tolerance impairment. In newborn and infancy, the important role of Tregs on the allergic disease such as atopic dermatitis and cow's milk allergy was demonstrated. They have also role to control inflammatory reactions against microorganisms. Vitamin D induce dendritic cells (DC) in order to function treg's modulation of immune tolerance (in allergy, inflammatory response and autoimmunity). In this study we aimed to study association of cord blood vitamin D levels and the regulatory T cells. The study group comprised of 101 newborn whose gestational age was 38 weeks or more. Cord 25(OH) D levels was measured and CD4, CD25 was analysed. Newborns were divided into two groups according to the 25(OH) D levels (< 12 ng/ml and >12 ng/ml). There were no difference in white blood cell, total lymphocyte count, T helper, Treg cell percentage and number between two groups. There were also no correlations between vitamin D levels and T cell subset number and percentages.

Keywords: Vitamin D, regulatory T cells, cord blood, newborn

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Vitamin D Metabolizması	3
2.2. Vitamin D'nin Kemik Metabolizması Üzerine Etkisi.....	4
2.3. Vitamin D Düzeyinin Değerlendirilmesi	5
2.4.Vitamin D Eksikliği	5
2.5. Vitamin D'nin Kemik Metabolizması Dışındaki Etkileri	6
2.5.1. Vitamin D ve kanser.....	6
2.5.2. Vitamin D ve tüberküloz.....	6
2.5.3. Vitamin D ve Tip 1 diabet.....	7
2.5.4.Vitamin D ve transplantasyon	7
2.5.5.Vitamin D ve kardiyovasküler hastalıklar.....	7
2.5.6.Vitamin D ve diğer hastalıklar	7
2.6. 1,25(OH) ₂ D ₃ 'ün in vitro immünomodülatuar etkileri	8
2.6.1. Vitamin D'nin APC (Monosit, makrofaj ve dendritik hücreler) üzerindeki etkileri.....	8
2.6.2. Vitamin D'nin T lenfositler üzerindeki etkileri.....	9
2.6.3. Vitamin D'nin düzenleyici T lenfositler üzerindeki etkileri	12
2.6.3.1. Treglerin fenotipik özellikleri	15
2.6.3.2. Foxp3 ve IL-2/IL-2 reseptör komponentlerinin anahtar rolleri.....	15
2.6.3.3.Tregler ve efektör T hücreler arasındaki dengesizlikten kaynaklanan hastalık modelleri.....	16
2.6.3.3.1. Otoimmün ve allerjik hastalıklar.....	16
2.6.3.3.2. Enfeksiyon hastalıkları.....	16
2.6.3.4. Treglerin terapötik potansiyelleri	16

2.6.3.4.1.1,25(OH) ₂ D ₃ ve analoglarının in vivo immunomodölatör kapasiteleri.....	17
2.6.3.4.2.1,25(OH) ₂ D ₃ ve analoglarının in vivo kullanımı	17
<u>3.GEREÇ ve YÖNTEM</u>	19
3.1. Çalışma Grubunun Seçimi	19
3.2. Laboratuvar Yöntemleri	19
3.2.1.Monoklonal Antikorların Hazırlanması	19
3.2.2.CD4/CD25 TREG analizi	20
3.2.3.25(OH)D analizi.....	22
3.3.İstatiksel Değerlendirme	22
4. BULGULAR.....	23
5.TARTIŞMA	29
6.SONUÇLAR	36
<u>7.KAYNAKLAR</u>	38

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

APC, antijen sunan hücre “antigen presenting cell”

CD, ayırım kümesi “cluster of diferentiation”

CTL, sitolitik T lenfosit “cytolytic T lymphocyte”

CTLA, sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen-4 “cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4”

DC, dendritik hücre “dendritic cell”

EAE, deneysel otoimmün ensefalomyelit “Experimental autoimmune encephalomyelitis”

FOXP3, Forkhead box-P3

GITR, Glukokortikoidle uyarılan tümör nekroze edici faktör “Glucocorticoid induced tumour necrosis factor”

GM-CSF, Granülosit makrofaj uyarıcı faktör “Granulocyte macrophage stimulating factor”

GVHD, Graft versus host hastalığı “Graft versus host disease”

HIV, İnsan immün yetmezlik virüsü “Human Immune Deficiency Viruse”

IBD, İnflamatuar barsak hastalığı “Inflammatory bowel disease”

IFN, İnterferon gamma “Interferon gamma”

Ig, İmmünglobülin “İmmunglobuline “

IL, İnterlökin “Interleukine “

IPV, İnaktif polio aşısı “Inactive polio vaccine”

KO, Knock out

MHC, Ana histokompatibilite kompleks “Major histocompatibility complex”

NOD, Obez olmayan diabetik “Non obese diabetic”

NK, Doğal öldürücü “Natural killer”

TCR, T hücre reseptörü “T cell receptor”

TGF- β , Transformasyonu sağlayan büyüme faktörü beta “Transforming growth factor beta”

TH, T yardımcı hücre “T helper cell”

TREG, Düzenleyici T hücre “Regulatory T cell”

TSLP, Timik stromaya ait protein “Timic stromal protein”

VDR, Vitamin D reseptörü “Vitamin D receptor”

$\gamma\delta$ T, Gamma delta T hücre “Gamma-delta T cell”

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Vitamin D kaynakları, metabolizması ve etkileri	4
Şekil 2.2. Lenfosit alt grupları.....	10
Şekil 2.3. Bağışıklık yanıtının T hücreleri tarafından baskılanması	13
Şekil 2.4. Vitamin D'nin immünomodülatör etkileri	14
Şekil 2.5. Doğal oluşan Treglerin karakteristik fenotipik markerları	15
Şekil 3.1. A kapısı	20
Şekil 3.2. B Kapısı.....	21
Şekil 3.3. Treg yüzdesi	22
Şekil 4.1. Vitamin D düzeyi ile Treg sayısının serpmme çizimde gösterilmesi.	26

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. Gebelerin ve yenidoğanların demografik özellikleri	23
Tablo 4.2. Yenidoğanların T lenfosit, Thelper ve Treg sayı ve yüzdelерinin ortalama ve standart sapması (SD).....	24
Tablo 4.3. Vitamin D düzeyleri ile T lenfosit, T helper, Tregülatör hücre sayı ve yüzdelерinin korelasyonu	25
Tablo 4.4. Grup 1 ve 2'nin demografik özellikleri.....	27
Tablo 4.5. Gruplardaki yenidoğanların 25(OH)D düzeyleri ve T lenfosit, T Helper ve T regülatör hücre, sayı ve yüzdelерinin karşılaştırılması.....	28

YENİDOĞAN BEBEKLERDE KORDON KANINDA VİTAMİN D DÜZEYİNİN DÜZENLEYİCİ T LENFOSİTLER ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Vitamin D kalsiyum ve fosfat metabolizmasında önemli rol oynayan, kemiğin büyümesi ve devamlılığı için gerekli olan bir vitamindir (1). Vitamin D eksikliğinde görülen rikets iyi tanımlanmış bir problemdir (2-4). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar vitamin D'nin kemik metabolizması dışındaki organların fonksiyonlarında da etkili olduğunu göstermiştir (1).

Vitamin D deride sentezlenir ve yiyeceklerle dışarıdan alınır. Hepatik hidroksilasyondan sonra 25-hidroksivitamin D₃, böbreklerde 1,25(OH)₂D₃ (calsitriol)'e hidroksile olur. Bu aktive form hücre çekirdeğinde (gen upregülasyonu) ve hücre yüzeyinde (hızlı yanıt) etki ederek 30'dan fazla organ ve dokuda 200'den fazla gen üzerinde etki gösterir. Birçok dokuda calsitriol için reseptör vardır (5-7).

Vitamin D'nin in vivo ve in vitro immün yanıt üzerine etkileri de bulunmuştur (5-8). Nükleer Vitamin D reseptörlerinin (VDR) makrofaj ve dendritik hücre (DC) gibi antijen sunan hücrelerin (antigen presenting cell, APC) ve aktive T lenfositlerin üzerinde exprese edildiği gösterilmiştir (9).

Düzenleyici T hücreler (Treg) efektör T hücrelerinin aktivasyonu düzenlerler. Böylece immün tolerans bozuklukları sonucu oluşabilecek otoimmün reaksiyonları engeller. Allerjik yanıtlar ve tip 1 diabet gibi otoimmün hastalıklar, deneysel otoimmün ensefalomyelit (10-12), gastrit, kolit (13), glomerulonefrit, poliartrit (14), allograft rejeksiyonu (15) ve GVHD (16-17) gibi hastalıklar Treg hücrelerin yetersiz çalışması ile ilgilidir. Yenidoğanda ve erken bebeklikte görülebilen atopik egzema, inek sütü alerjisi gibi allerjik hastalıklarda ve mikroorganizmalara karşı inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde Treg önemli rolü olduğu gösterilmiştir (18,19). Vitamin D [1,25 (OH)₂D₃], DC'leri, düzenleyici T lenfositlerin immün toleransı sağlaması için uyarır; düzenleyici T lenfositlerin alerji, inflamatuvar yanıt ve otoimmünitenin kontrolündeki işlevini yapmasını sağlar (20).

Vitamin D eksikliği gebeler ve yenidoğanlarda sıktır. Vitamin D eksikliğinin hayvan ve erişkin çalışmalarında Treg fonksiyonlarını azalttığı gösterilmiştir. Vitamin D düzeyinin yenidoğanın Treg hücresi üzerine etkisi ise çalışılmamıştır. Bu çalışmada kord kanından ölçülen vitamin D düzeyinin bebeğin düzenleyici T hücreleri üzerine etkisini araştırmayı hedefledik.

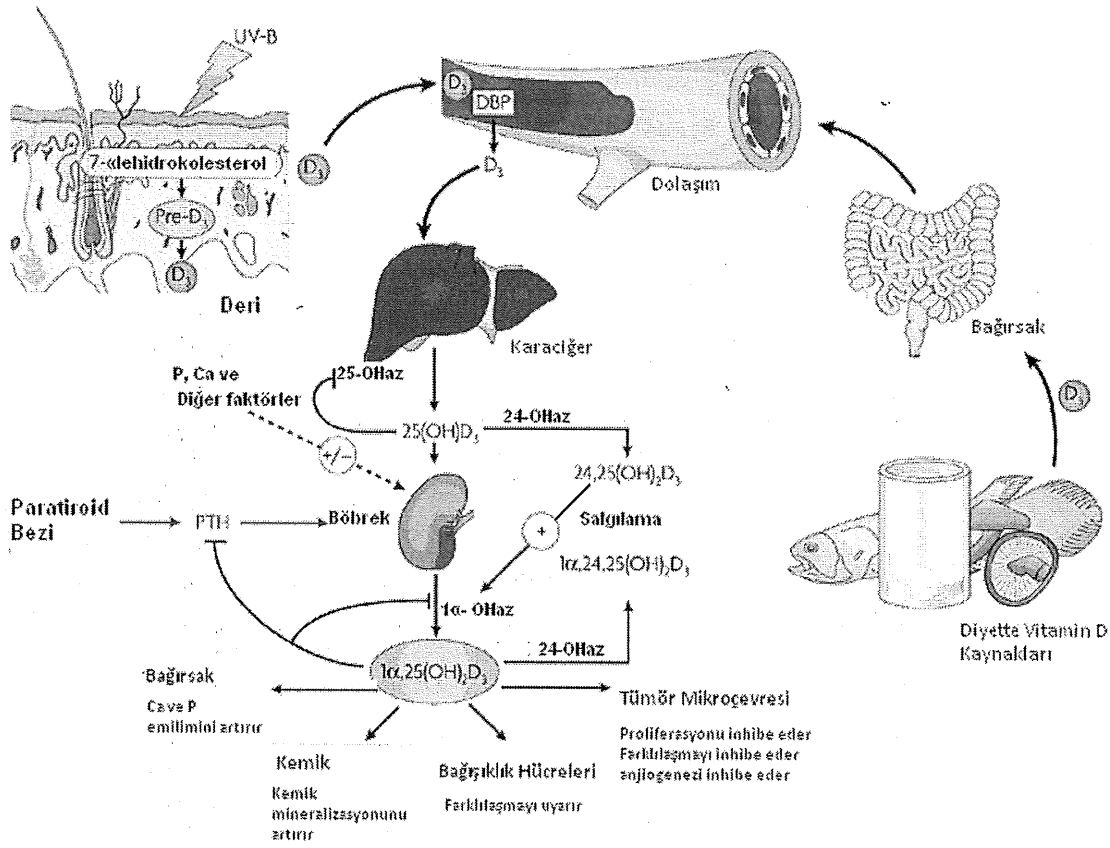
2.GENEL BİLGİLER

2.1.Vitamin D Metabolizması

Vitamin D'nin insanlarda iki şekli bulunur. Bunlar; vitamin D₃ (kolekalsiferol) ve vitamin D₂ (ergokalsiferol) dır. Vitamin D₃ deride güneş ışınları ile 7-dehidrokolesterolden elde edilir ve gereksinimin %90-95'ini karşılar. 7-dehidrokolesterol 290-315 dalga boyundaki ultraviole B- güneş ışınları ile previtamin D₃'e dönüştürülür. Previtamin D₃'den izomerizasyon ile vitamin D₃ oluşur. Günlük vitamin D üretiminin plato düzeyine, ultraviole B radyasyonuna 30 dk karşılaşma sonrası ulaşılabilir (21). Deride vitamin D sentezi, ultraviole B enerjisinin miktarına (enlem, mevsim, günün saati), güneşle temas eden cilt yüzey miktarına, karşılaşma süresine, cilt tipine göre değişir (22,23).

Vitamin D₃ dışardan diyetle özellikle yağlı balıklarla da alınabilir. Diğer diyet kaynakları ise yumurta ve D vitamini ile güçlendirilmiş besinlerdir (süt vb.). Özellikle yüksek risk grubunda, sadece diyetle, vitamin D'nin günlük alınması gereken miktarına ulaşmak mümkün değildir (23). Vitamin D₂ ise bitkilerin güneş ışınları ile karşılaşması sonucu oluşur (8).

Güneş ışınları ile deride sentez edilen ve besinlerle alınan D₂ ve D₃ vitaminleri karaciğerde 25-hidroksi D₂ ve 25-hidroksi D₃'ye çevrilir. Karaciğerde sentez edilen 25(OH)₂D₃, D vitamini bağlayan proteine (DBP) bağlanarak böbrek dokusuna taşınır, burada 1-alfa-hidroksilaz enzimi ile aktif D vitamini hormonu olan 1,25-dihidroksivitamin D'ye (kalsitriol) dönüştürülür. Renal kalsitriol sentezi homeostatik olarak PTH tarafından, PTH sentezi de serum Ca ve fosfor tarafından regüle edilir. Eğer 1,25-dihidroksivitamin D yeterli ise 25(OH)₂D₃'nin bir kısmı renal 24-hidroksilaz ile 24,25- dihidroksivitamin D'ye dönüştürülür. Bu daha az aktiftir ve metabolize edilir (21,8) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Vitamin D kaynakları, metabolizması ve etkileri

Hücelere taşınan 1,25-dihidroksi vitamin D, nükleer reseptör süperailisinin üyesi olan VDR'ye bağlanır. VDR'lerin 200'den fazla dokuda var olduğu bilinmektedir. Bunlar, bağırsak hücreleri, kas hücreleri, osteoblastlar, distal renal hücreler, paratiroid hücreler, pankreas adacık hücreleri, epidermal hücreler, dolaşımdaki monositler, transforme B hücreler, aktive T hücreler, nöronlar, plasenta, deri fibroblastları, kondrositler, kolon enterositleri, karaciğer hücreleri, prostat hücreleri, over hücreleri, deri keratinositleri, endokrin hücreler, hipofiz hücreler, aortik endotelial hücreler vb. dir (5-7).

2.2. Vitamin D'nin Kemik Metabolizması Üzerine Etkisi

3 temel etkisi mevcuttur;

1. D vitamini bağırsaktan kalsiyum ve fosfor emilimini artırır.
2. Kemik dokusu üzerine etki ederek kalsiyum mobilizasyonunu artırır. Bunun için PTH ile birlikte hareket eder.
3. Böbreklerden de kalsiyum emilimini artırır (8).

2.3. Vitamin D Düzeyinin Değerlendirilmesi

Dolaşımdaki 25(OH)D'nin düzeyleri, epiderminin maruz kaldığı güneş ışığı miktarını ve diyetle alınan vitamin miktarının yakın göstergesidir. Serum 25(OH)D düzeyi, vitamin D eksikliğini, yetersizliğini, hipovitaminozisi, toksisiteyi tanımlamada en iyi belirteçtir, doku vitamin durumunu gösteren en iyi göstergedir (24). Paratiroid hormonu uyaran 25(OH)D düzeyi 25 ng/ml'dir (25). Literatürde ağır vitamin D eksikliğini gösteren 25(OH)D konsantrasyonları ise <10-12 ng/ml'dir (26).

2.4. Vitamin D Eksikliği

Nutrisyonel veya vitamin D eksikliğinde görülen rikets, 20. yüzyılın başlarında Asya, Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupanın birçok alanında infant ve adolesanlarda epidemikti. Yaklaşık 80 yıl önce vitamin D'nin izole edilmesi ve vitamin D₃ eksikliğinde görülen riketsin tedavisinde ultraviolenin keşfinden sonra riketsin tedavisi ve önlenmesi mümkün olabildi (27).

Riketsin en sık pik yaptığı yaş 3-18 aydır. Bu yaşta sık görülmesinin altında yatan faktörler, vitamin D desteği yapılmadan sadece uzamış anne sütü ile beslenme, maternal vitamin D eksikliği, yanlış beslenme alışkanlıkları, ılıman iklimlerde yaşama, güneş ışınlarına maruziyet eksikliği, siyah koyu cilt rengine sahip olmadır (2,3).

Kuveyt'te yapılan bir çalışmada Molla ve ark. doğum sırasında annede 10 ng/ml'nin, bebekte 11 ng/ml'nin altını eksiklik olarak kabul edip annelerin % 40'ında, yenidoğanların % 60'ında vitamin D eksikliği saptamış, anne ve bebeklerin vitamin D düzeyleri yüksek oranda korele bulmuştur (28). Türkiye'de Alagol ve ark. premenopozal kadınlarda yaptıkları bir çalışmada, vitamin D düzeylerini modern giyinenlerin %44'ünde, İslami inanışlarına göre giyinenlerin hepsinde düşük olarak bulmuşlardır (4).

Amerikan Pediatri Akademisi en son 2003 yılında yayınladığı guideline'a göre;

1. Günde en az 500 cc vitamin D ile güçlendirilmiş formula veya süt almayan, tüm anne sütü alan süt çocuklarına
2. Günde 500 cc'den daha az vitamin D ile güçlendirilmiş formula veya süt alan, anne sütü almayan tüm süt çocuklarına

3. Günde 500 cc'den daha az vitamin D ile güçlendirilmiş süt alan, düzenli güneş ışını almayan veya en az günlük 200 IU multivitamin desteği almayan çocuk ve adolesanlara günlük 200 IU vitamin D suplementasyonunu önermektedir (29).

2.5. Vitamin D'nin Kemik Metabolizması Dışındaki Etkileri

Bağırsak, böbrekler ve kemik dokusu vitamin D metabolizmasının yer aldığı esas organlardır. D vitaminin parakrin ve otokrin etkileri vardır. 1970'li yıllarda radyoaktif işaretlenmiş kalsitriolün pek çok dokuda lokalizasyonunun gösterilmesi ile takibinde birçok hastalıkla ilişkisi olabileceği gösterilmiştir (30,31).

2.5.1. Vitamin D ve kanser

Vitamin D hücre büyümesini düzenleyen en etkili hormonlardan biridir. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hücre proliferasyonunu inhibe eder ve hücrelerin farklılaşmasını hızlandırır, bazı çalışmalarda anjiogenezisi inhibe ettiği, kanser hücrelerinin apoptozisini artırdığı gösterilmiştir. Fazla güneş ışığına maruziyetin prostat, meme ve kalın bağırsak kanserlerinden ölüm oranını azalttığı yönünde kanıtlar mevcuttur (32). Garland ve ark. 25620 kişiden oluşan kohort çalışmalarında, $25(\text{OH})_2$ düzeyleri 65-100 nmol /lt aralığında olanlarda, daha düşük düzeylerde olanlara göre kolorektal kanser insidansını düşük bulmuşlardır (33).

2.5.2. Vitamin D ve tüberküloz

1940'larda vitamin D tüberküloz tedavisinde enfeksiyonlara direnci artırdığı düşünüldüğü için kullanılmıştır (34). Daha sonra Vitamin D'nin aktif formunun in vitro olarak lenfosit ve monositlerin proliferasyonunu, diferansiasyonunu ve immün fonksiyonu düzenlediği görülmüştür (35).

Serum $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre tüberkülozlu hastalarda daha düşük bulunmuştur (36). Ayrıca, vitamin D, tüberkülozlu hastalarda granümatöz alanlarda extrarenal sentezlenir ve makrofajlar aracılı mikobakterilerin ortadan kaldırılmasını sağlar (37).

2.5.3. Vitamin D ve Tip 1 diabet

Hayvan modellerinde hastalık öncesi verilen vitamin D'nin tip 1 diabet gelişimini önlediği gösterilmiştir (38). Pozzilli P ve ark. İtalyada yaptıkları bir çalışmada yeni tanı tip 1 diabetik hastalarda ortalama $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ve $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulmuşlardır (39).

2.5.4. Vitamin D ve transplantasyon

Cantorna, $1,25$ -dihidroksi vitamin D ve analoglarının farelerde, kalp greft modellerinde diğer immünsüpresif ajanların yol açtığı gibi kemik kaybı ve fırsatçı enfeksiyonlara yol açmaksızın greft yaşamını uzattığını göstermiştir (40).

2.5.5. Vitamin D ve kardiyovasküler hastalıklar

Aterosklerozun sistemik inflamatuvar bir hastalık olduğu kabul görmektedir. Hayvan çalışmaları, IL-6'nın ateroskleroza artırdığını göstermiştir (41). Calcitriol, IL-6 ve TNF- α sekresyonunu in vitro olarak baskılayabilir (42). Ayrıca epidemiyolojik çalışmalarda, myokardial infarktüs ile plasma 25 -hidroksi vitamin D3 düzeyleri arasında ters orantı olduğu gösterilmiştir (43).

2.5.6. Vitamin D ve diğer hastalıklar

Vitamin D'nin yukardaki hastalıkların gelişimi üzerine etkileri yanında diğer bazı otoimmün hastalıkların gelişimi ile de ilgisi olabileceği öne sürülmektedir. İmmün işlev bozukluğunun ön planda olduğu bu hastalıklar romatoid artrit, inflamatuvar barsak hastalığı, sistemik lupus eritematozus, osteoartrit ve periodontal hastalıktır. Bununla birlikte bu konularda yapılan çalışmaların çoğu epidemiyolojik ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar olup insanlar için etkisi net olarak bilinmemektedir.

Merlino yaklaşık 30.000 kadını 11 yıl boyunca izlemiş ve günlük vitamin D alımı 200 IU'den az olan kadınlarda romatoid artrit gelişme riskinin almayanlara göre %33 oranında daha fazla olduğunu göstermiştir (44).

Cantorna hayvan modellerinde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ desteğinin inflamatuvar barsak hastalığı bulgularını hafiflettiğini göstermiştir (45).

Ivanov yaptığı çalışmada IPV'nin (inaktif polio vaccine) üç serotipi ile aşıladığı farelerde aşı ile birlikte verilen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0.1 mg) vitamin desteğinin serotip 2 ve 3'de serum IgG, serotip 1'de tükrük IgA düzeyinde ve her üç serotip için nötralize antikor düzeylerinde dramatik artış yaptığını göstermiş ve aşılama adjuvan olarak D vitamininin kullanılabileceğini bildirmiştir (46).

2.6. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün in vitro immünomodülatuar etkileri

2.6.1. Vitamin D'nin APC (Monosit, makrofaj ve dendritik hücreler) üzerindeki etkileri

Mikropların vücuda giriş yerleri yani deri, gastrointestinal sistem ve solunum sistemi, epitel içine yerleşmiş ve antijenleri yakalayıp periferik lenfoid dokulara taşıyan özgül hücrelerle döşelidir. Antijen yakalama işlevleri, en iyi dendrit benzeri çıkıntıları nedeniyle, dendritik hücreler adı verilen hücrelerde tanımlanmıştır (47).

Dendritik hücreler, periferik kanda % 0,1'den daha az oranda bulunurlar. Antijenleri yakalayıp T hücrelerine sunarak primer immün cevapların oluşmasında etkindirler (48). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ VDR –bağımlı bir mekanizmayla dendritik hücre matürasyonunu inhibe eder. İn vitro olarak prekürsörlerden DC farklılaşması $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ile inhibe olur. DC'lerin APC fonksiyonu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ile azalır. Ayrıca $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ile MHC klas-2'nin, kostimülatuar moleküllerin (CD86, CD40, CD80 gibi) ve diğer matürasyonla indüklenen CD1a ve CD83 gibi proteinlerin yüzey ekspresyonu in vivo ve in vitro matürasyon sırasında anlamlı olarak azalır (49,50).

Monosit ve daha etkin olarak makrofajlar, immün regulasyonda antijenik uyarıyı, antijen sunan hücre (APC) olarak T hücrelerine sunarak immün cevabın oluşmasını sağlarlar (51). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ye maruz kalan monositlerin anlamlı olarak major MHC class 2 ekspresyonu ve T hücre uyarma kapasiteleri azalır. Ayrıca bu monositlerin yüzeyinde eksprese edilen ve T hücre aktivasyonu için asıl gerekli olan kostimulatör reseptörlerin ekspresyonunu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe eder (53). Bu inhibisyona zıt olarak ise monosit ve makrofajların, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ye maruziyet sonrası, tümör hücre sitotoksitesi ve mikobakteriel aktivite için gerekli olan kemotaktik ve fagositik kapasiteleri artar (52).

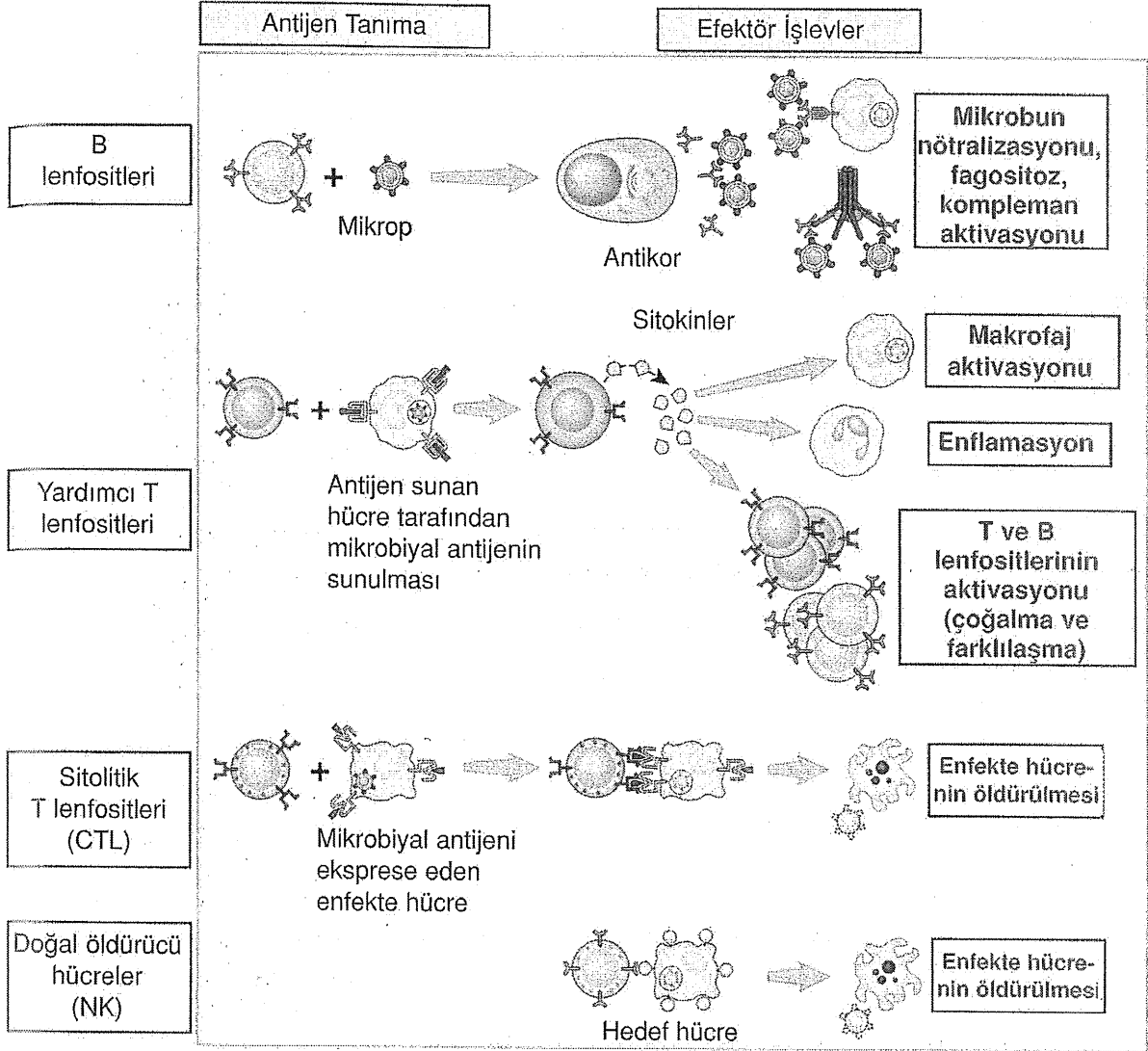
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'den APC'ler tarafından sekrete edilen ve T lenfositlerin aktivasyonu için gerekli olan sitokinlerin sentezi de etkilenir. IL-12, immün sistemin hangi yöne aktive

olacağını belirleyen major sitokindir. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ile IL-12 sekresyonu, DC ve diğer APC'ler de inhibe olur. IL-12, CD4+TH1 lenfositlerin gelişimini uyarırken, CD4+TH2 lenfositlerin gelişimini ise inhibe eder, böylece in vivo ve in vitro olarak immün kaskad dönüşümü TH1 den TH2 yönüne gerçekleşir. DC'ler tarafından ifade edilen ve IL-12 ye zıt olarak etki gösteren bir immünsüpresif sitokin olan IL-10 sentezi, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ile artar (49,50). Kısaca $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, DC –bağımlı T hücre aktivasyonunu inhibe eder.

2.6.2. Vitamin D'nin T lenfositler üzerindeki etkileri

Lenfositler antijenlere özgül reseptörler taşıyan tek hücre grubudur yani edinsel immüniteyi düzenleyen anahtar hücrelerdir. Günümüzde bu hücreler, monoklonal antikor panelleri ile tanınabilen yüzey proteinleri aracılığı ile birbirlerinden ayırt edilmektedir. Bu proteinlerin standart sınıflaması “CD” (ayırım kümesi, “cluster of differentiation”) sayısal tanımlamasıdır, bunlar belli bir hücre tipi veya hücre başkalaşım evresini tanımlamak için kullanılırlar ve bir antikor kümesi veya grubu tarafından tanınırlar (47).

Lenfositler; B lenfositler, yardımcı T lenfositleri, sitolitik T lenfositleri (CTL), doğal öldürücü hücreler (NK) olarak alt gruplara ayrılır (47) (Şekil 2.3).



Şekil 2.2. Lenfosit alt grupları

B lenfositleri, antikor üretebilen tek hücre grubudur, yani bunlar humoral bağışıklığı düzenleyen hücrelerdir. T hücreleri ise hücresel immünitinin hücreleridir. T hücrelerinin antijen reseptörleri, yalnızca peptid yapılı antijenleri tanır; bu peptidler majör histokompabilite antijenleri (MHC) adı verilen özel peptid sunan moleküllere bağlı durumdadırlar. Bu moleküller antijen sunan hücreler (APC) adı verilen bir grup özelleşmiş hücrelerde bulunurlar. T lenfositler arasında CD4+ T hücrelerine yardımcı T hücreleri adı verilmektedir, çünkü bu hücreler antikor yapımı için B lenfositlerine ve yutulmuş mikropların yıkımı için fagositlere yardım ederler. CD8+ hücreler ise sitotoksik veya sitolitik T lenfositleri (CTL) olarak adlandırılırlar, çünkü bu hücreler hücre içi mikropları taşıyan hücreleri öldürürler, diğer hücreleri lizise uğratırlar.

Üçüncü bir sınıf lenfosit ise doğal öldürücü (natural killer-NK) hücreler olarak bilinirler, bu hücreler doğal immüitenin bir parçasıdır, B ve T hücrelerinde bulunan antijen reseptörlerine sahip değildirler.

Tüm lenfositler kemik iliğindeki kök hücrelerden gelişir. B lenfositleri kemik iliğinde olgunlaşırken, T lenfositleri timusta olgunlaşırlar. Olgun lenfositler, yüzeylerinde taşıdıkları özgül reseptörü tanıyan antijen ile karşılaştıklarında dolaşıma geçer ve periferik lenfoid organa göç ederler. Antijenle karşılaşmamış olgun B veya T lenfositine naif lenfosit denir. Naif lenfositler, mikrobiyal antijenleri tanımaları ve aynı zamanda mikrobun uyardığı ek (ikincil) tehlike uyarılarını da algıladıkları zaman, antijene özgül lenfositler çoğalır, efektör hücrelere ve bellek hücrelerine dönüşürler. Naif lenfositler antijenler için reseptör taşımalarına rağmen antijeni ortadan kaldıracak işlevleri yapamazlar. Hücrelerin efektör hücrelere ve bellek hücrelere dönüşmeleri, antijen tanınmasıyla başlar. B lenfosit hücre dizisinin efektör hücresi, antikor salgılayan plazma hücresidir. Efektör CD4+ T hücreleri de, B hücreleri ve makrofajları efektör kılan, böylece bu hücre dizilerinin yardımcı işlerini düzenleyen sitokinleri üretirler, efektör CD8+CTL hücreleri enfekte konak hücrelerini öldüren yeteneğe sahiptirler (47).

CD4+ yardımcı T hücreleri değişik sitokinleri üreterek farklı fonksiyonlara neden olan efektör hücre alt gruplarına farklılaşabilirler. Bu alt grupların en iyi tanımlananı TH1 hücreleri ve TH2 hücreleri (Tip 1 yardımcı T hücreleri ve Tip 2 yardımcı T hücreleri) olarak adlandırılmıştır. TH1 hücreleri tarafından üretilen en önemli sitokin interferon-gama (IFN- γ) dır ve viral enfeksiyonu inhibe eden sitokin olarak tanımlandığı için bu ad verilmiştir. IFN- γ , makrofajların güçlü bir aktivatörüdür. Bu nedenle TH1 hücreleri fagosit aracılı sindirimi ve mikropların öldürülmesini uyarır, bu nedenle hücresel immüitenin anahtar taşıdır. TH2 hücreleri ise, IgE, antikor üretimini stimüle eden IL-4 ile eozinofilleri uyaran IL-5 üretirler. Bu nedenle TH2 hücreleri özellikle helmintik parazitlere karşı etkili eozinofil aracılı, fagosit bağımsız immüiteyi stimüle eder. IL-4,10,13 gibi TH2 hücreleri tarafından üretilen sitokinlerin bazıları makrofaj aktivasyonunu inhibe eder ve TH1 aracılı immüiteyi baskılar. Bu nedenle bir mikroba karşı hücre aracılı immün yanıtların etkisi bu mikroba yanıtta TH1 ve TH2 hücrelerinin aktivasyonu arasındaki denge ile sağlanabilir (53).

1,25(OH) $_2$ D $_3$ 'nin vitro eklenmesiyle, antijen veya lectinle uyarılmış olan insan ve murine T lenfosit proliferasyonu, sitokin sekresyonu ve hücre döngüsünün G1a'dan G1b'ye

ilerlemesi inhibe olur. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'nin direk hedefi, $\text{IFN-}\gamma$ ve IL-2 gibi TH1 lenfositlerin anahtar sitokinlerinin transkripsiyonudur. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $\text{IFN-}\gamma$ transkripsiyonunun inhibisyonu ile T lenfositlere antijen sunumunu inhibe eder, çünkü $\text{IFN-}\gamma$ transkripsiyonu antijen sunumu için en majör pozitif feedback sinyaldir (54). IL-2 ise T lenfositler için otokrin bir büyüme faktörüdür, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, IL-2 sentezini inhibe ederek T lenfositlerin aktivasyon ve proliferasyonunu önler (55).

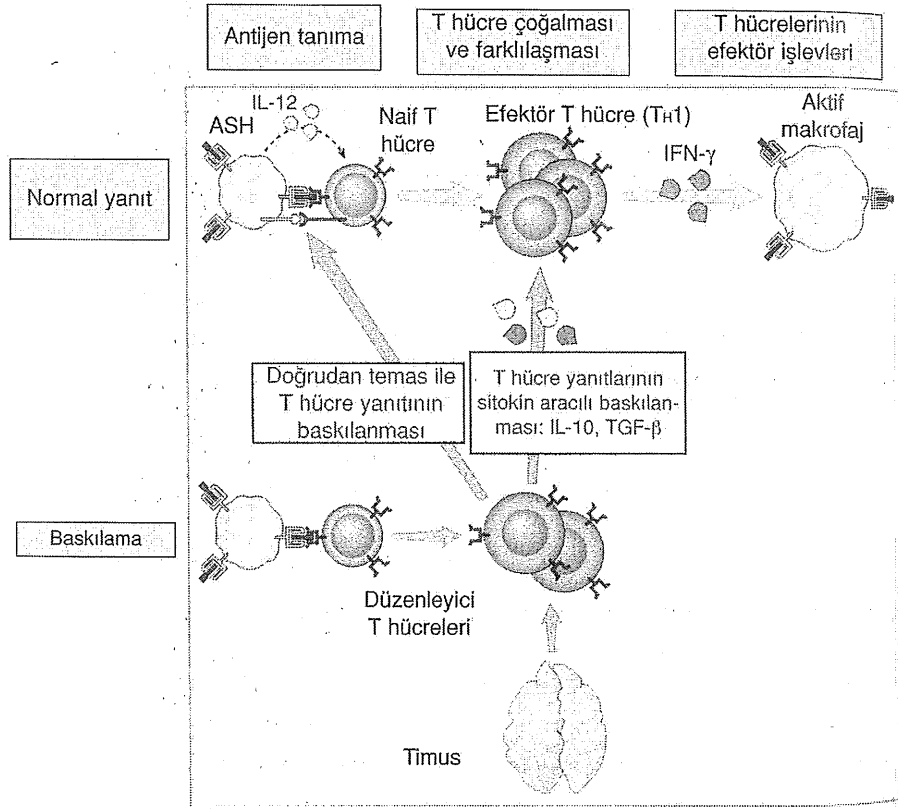
CD4+TH1 lenfositler ($\text{IFN-}\gamma$ ve IL-2 sekresyonu ile) graft rejeksiyonunda ve otoimmün hastalıklarda anahtar aracı iken, TH2 lenfositlerin (IL-4,5,13 sentezi ile) daha düzenleyici fonksiyonları vardır. TH1 sitokini olan $\text{IFN-}\gamma$ ve IL-2 sekresyonun $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ile inhibisyonu sonucu indirek olarak CD4+T lenfositlerin polarizasyonu TH2 yönüne olur, böylece otoimmünite ve graft reddi azalır. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ayrıca TH2 türünde sitokinlerin üretimini artırır. Boonstra ve ark. in vitro $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tedavisi ile TH2 sitokinlerinin üretimini, böylece IL-4,5,10 üretiminin arttığını göstermişlerdir. IL-4'ün $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ilişkili upregülasyonu ile in vivo olarak otoimmünitede koruyucu rolü desteklenebilir (57). Diğer T lenfosit sitokinlerinin sentezi de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'den etkilenir. Enfeksiyona inflamatuvar yanıtta matür granüositleri ve makrofajları aktive eden GM-CSF (granulosit-makrofaj stimüle edici faktör) in vitro $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tedavisi ile down-regüle olur (56).

2.6.3. Vitamin D'nin düzenleyici T lenfositler üzerindeki etkileri

Konağın infeksiyonu kontrol etmesinde kullanılan efektör mekanizmalar, sitokin ve kemokinlerin üretimi, lökositlerin inflamasyon alanına toplanması, T hücre ve NK hücrelerin aktivasyonu şeklindedir. Bu yanıtların fazla doku yıkımını ve otoimmünitenin gelişmesini engellemek için düzenli olarak kontrol edilmesi lazımdır (57)

1995 yılında Sakaguchi ve ark. sağlıklı farede yaşamın 3. günü periferde ortaya çıkan, 2 hafta içinde toplam periferik CD4+ popülasyonunun %5- 10'unu oluşturan bir periferik CD4+ T hücre alt grubunu tariflediler. Bu CD4+T hücreler IL-2R α -zinciri (CD25) exprese ederler ve otoimmün hastalıkların gelişiminin kontrol edilmesinde kritik role sahiptirler (57). Watanabe ve ark. insan timusundaki Hassall corpüsküllerinin, dendritik hücre ilişkili CD4+CD25+Tregülatör (Treg, düzenleyici T hücre) üretiminde kritik bir role sahip olduğunu gösterdiler. Hassall korpüskülleri timik stromal protein üretir (TSLP). TSLP, timik CD11c-pozitif dendritik hücrelerin CD80 ve CD86 exprese etmesini sağlar. Bu

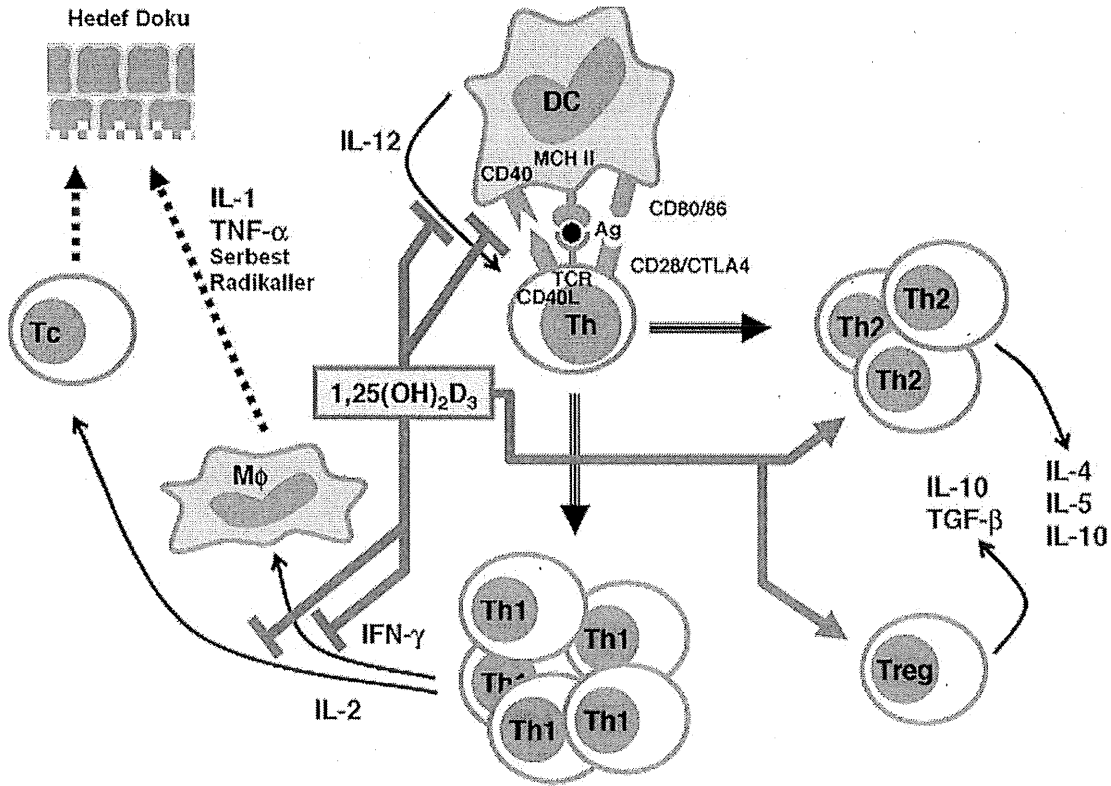
DC'ler böylece CD4+CD8-CD25- timik T hücrelerinin, CD4+CD25+Foxp3 (forkhead box P3) Treg hücrelerine çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayabilir hale gelir (58).



Şekil 2.3. Bağışıklık yanıtının T hücreleri tarafından baskılanması

Bu zamana kadar in vivo ve in vitro düzenleyici özelliği olan, otoimmün hastalıkların kontrolünde, allotransplantasyon toleransında, tümöre karşı immün yanıtlarında etkisi olan çeşitli T hücre popülasyonu tanımlanmıştır. Doğal ortaya çıkan düzenleyici T hücreler kemirgen ve insanlarda identifiye edilmiştir ve adaptif immün sistemin CD4+CD25+Foxp3 T hücrelerinden ve innate immün sistemin natural killer (NK) T hücrelerinden oluşur (59-61). Doğal düzenleyici T hücreleri yanında in vivo ve in vitro müdahale ile T hücreleri, düzenleyici hale dönüştürülebilir. Dendritic hücrelerle tekrarlayıcı in vitro uyarı ile veya IL-10 ve TGF-β gibi baskılayıcı sitokinlerin varlığında düzenleyici T hücreleri indüklenebilir. Diğer düzenleyici özelliği olan hücreler CD4+ olan Tr1 ve TH3 hücreler (62-64), CD8+CD28-T hücreler (65), çift negatif CD3+CD4-CD8- T hücreler (66) ve γδT (67) hücreler şeklinde in vivo ve in vitro ortamlarda gösterilmiştir. CD4+CD25+Foxp3 T hücreleri (TREG) in vitro olarak T cell receptor (TCR) uyarısına yanıtsızdırlar, eksojen IL-2, anti-CD28 monoklonal antikorların artan konsantrasyonlarıyla veya mitojenler ile TCR

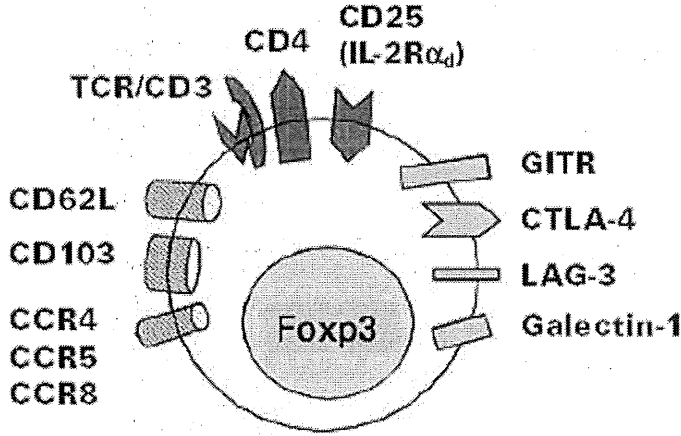
stimülasyonunun bypass edilmesiyle anejik hallerinin üstesinden gelinebilir (49). Poliklonal veya antigen spesifik TCR stimülasyonu ile Treg hücreleri, IL-2'den transkripsiyonunu inhibe ederek efektör CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin proliferasyonunu ve sitokin üretimini güçlü bir şekilde inhibe ederler (68-71) ayrıca B hücrelerinin de çoğalma ve antikor üretimlerini inhibe ederler (72). İn vitro TCR uyarısı sonucu çoğalmaya dirençli olan Tregler in vivo antijenik stimülasyon sonucu aktif olarak çoğalırlar (73-74). İn vivo olarak doğal oluşan Tregler self- ve aaloantijenlere periferik toleransın devamlılığında anahtar rol oynarlar (75-76). CD4+CD25+ T hücrelerinin deplesyonu efektif tümör immünitesini indükler (77-80), istilacı mikroplara karşı immün yanıtı artırır, zararsız çevre yapılarına karşı alerjik yanıtları tetikler ve gebelik sırasındaki fetomaternal toleransı kırar (81). Diğer bir yanda Treg hücrelerin birçok T hücre aracılı immün hastalıkları baskıladığı görülmüştür; alerjik yanıtlar ve tip 1 diabetes gibi otoimmün hastalıklar, deneysel otoimmün ensefalomyelit (10-12), gastrit, kolit (13), glomerulonefrit, poliartrit (14), allograft rejeksiyonu (15) ve GVHD (16,17) gibi.



Şekil 2.4. Vitamin D'nin immünomodülatör etkileri

2.6.3.1. Treglerin fenotipik özellikleri

Treglerin baskılayıcı özellikleriyle en iyi bağlantılı olan işaretleyici CD25'dir (Şekil 2.3). Buna rağmen dğzenleyici özelliği olan hücreler CD4+CD25-T hücre havuzunda da bulunmuştur (82,83). Doğal oluşan CD4+CD25+T hücrelerin ifade ettiği diğer işaretleyiciler şekilde görülmektedir.



Şekil 2.5. Doğal oluşan Treglerin karakteristik fenotipik markerları

2.6.3.2. Foxp3 ve IL-2/IL-2 reseptör komponentlerinin anahtar rolleri

Bir transkripsiyon faktörü olan Foxp3'ün Tregler için yüksek oranda spesifik bir intraselüler marker olduğu gösterilmiştir (84-86). Foxp3, IL-2 ve IL-2 reseptörünün komponenti olan CD25 Treglerin gelişimi, fonksiyonu ve yaşaması için gereklidir, bu molekülleri kodlayan genlerdeki mutasyon veya polimorfizmler kemirgen ve insanlarda otoimmün hastalıklara zemin hazırlar (87).

Treglerin çalışma mekanizmaları halen net değildir, temas bağımlı (CTLA-4, TGF-beta, GITR, Galectin -1) ya da sitokin ilişkili (IL-10, TGF-beta) etkinin hangisinin tam olarak baskılayıcı mekanizmada etkili olduğu konusunda farklı görüşler vardır (88).

2.6.3.3. Tregler ve efektör T hücreler arasındaki dengesizlikten kaynaklanan hastalık modelleri

2.6.3.3.1. Otoimmün ve allerjik hastalıklar

Artık Treglerin in vivo olarak self reaktif T hücrelerin aktivasyon ve genişlemesini baskıladığı, dolayısıyla otoimmün hastalıkların gelişimini baskıladığı bilinmektedir. Neonatal timektomi veya Treglerin normal hayvanlardan deplesyonu birçok organda kendiliğinden otoimmün hastalığın (gastrit, IBD, T1D, EAE, myokardit) gelişmesine ve deri allograftlerine karşı artmış alloyanita neden olur (57,60). Bu vakalarda farenin yeniden vahşi tip Treg ile rekonstrüksiyonu sonrası otoimmünite engellenebilir. Allerjik reaksiyonların düzenlenmesinde Treglerin TCR transgenik fare modellerinde antigen spesifik IgE üretimini baskıladığı gösterilmiştir (89). Atopik dermatitli hastaların periferik kanlarında ve deri biopsi örneklerinde Treg sayısının arttığı gözlenmiştir (20). İnek sütü alerjisi patogenezinde de Treglerin önemli rol aldığı gösterilmiştir (19).

2.6.3.3.2. Enfeksiyon hastalıkları

Tregler tüm enfeksiyon ajanlarına karşı immün yanıtı katılırlar; adaptif immün yanıtı düzenleme yanında, kemirgende patojen ilişkili kolit modelinde direkt olarak innate immün yanıtı baskılayabildikleri gösterilmiştir (90). Birçok kronik enfeksiyon hastalığında Treglerin konak doku hasarını sınırlamak için immün reaktiviteyi baskıladıkları ancak aynı zamanda koruyucu immüniteyi ve patojenlerin temizlenmesini de baskıladıkları görülmüştür (91).

2.6.3.4. Treglerin terapötik potansiyelleri

Tregler otoimmünite gibi inflamatuvar hastalıklarda (allograft rejeksiyonu veya GVHD gibi) aktiviteleri artırılarak veya tümör immünitesi veya aşı geliştirilmesinde baskılayıcı aktiviteleri bloke edilerek immünoterapötik araç olarak kullanılabilir (92-98). Daha önceden antijenle karşılaşmamış normal bireylerde, alloantijen cros-reaktif Treg prekürsörlerinin sayılarının az olması nedeniyle bu spesifik popülasyonun adoptif transfer için in vivo olarak çoğaltılması veya in vitro olarak çok sayıda üretilmesi gerekir. Yeni deneysel bir çok çalışmada antijen spesifik Treglerin karakteristik fenotiplerini ve regülatör özelliklerini kaybetmeden yeterli oranda üretilip, çoğaltılabileceği gösterilmiştir (99-103).

APC'ler ve özellikle dendritik hücrelerin vivo ve in vitro olarak VDR ligandlarının anahtar hedefidirler. Son zamanlarda DC'lerin hem intratimik hem periferde sadece immünogenik değil aynı zamanda tolerogenik olabileceği gösterilmiştir. Özellikle immatüre DC'lerin tolerojenik özellikleri olduğu ve T hücrelerini baskılayıcı aktivite yönünde indükledikleri gözlenmiştir (104). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, DC matürasyonunu ve diferansiasyonunu inhibe eder, aktivasyon ve survivalini düzenler, DC'leri tolerogenik fenotipe dönüştürür. VDR ligandları DC'leri, baskılayıcı T hücre üretimini desteklemek için tolerogenik özellikleri yönünde indüklerler. Bu etkiler sadece in vitro olarak sınırlı değildir, alıcıya oral uygulama sonrası allograft rejeksiyonunun gözlenmesiyle (20) veya in vitro işlem görmüş DC'lerin adoptif transferi ile in vivo olarak gösterilmiştir (105). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ile kısa süreli tedavi edilen tolerogenik DC'ler, bu hormonun $\text{CD4}+\text{CD25}+\text{supresör}$ T hücreleri indükleyerek transplantasyon toleransının sağlanmasında görevlidirler (20).

2.6.3.4.1.1,25(OH)₂D₃ ve analoglarının in vivo immunomodülatör kapasiteleri

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'nin immün sistemi sadece supresyon yönünde değil aynı zamanda immün shiftlerin başlaması ve düzenleyici hücrelerin düzenlenmesi yönünde etkilemesi $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'yi klinik kullanımda özellikle otoimmün hastalıkların tedavi ve önlenmesinde ve graft rejeksiyonunun önlenmesinde çekici kılmıştır. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'nin immünomodülatör etkilerinin klinik kullanımında en büyük sakınca hiperkalsemi, hiperkalsüri, renal kalsifikasyon ve artmış kemik yıkımı gibi doz sınırlayıcı yan etkileridir. Bu nedenle dah az hiperkalsemik potansiyeli olan, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün immunomodülatör etkilerini devam ettiren veya artıran sentetik analogları geliştirilmiştir (106).

2.6.3.4.2.1,25(OH)₂D₃ ve analoglarının in vivo kullanımı

Otoimmün tip 1 diabetin obez olmayan daibetik farelerde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ve analogları ile önlenebileceği gösterilmiştir (107,108). Otoimmün hastalıkların önlenmesinin yanısıra $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ve analoglarının devam etmekte olan otoimmün hastalığın tedavisinde de faydalı olduğu, NOD farelerde başlangıçtaki beta hücre etkilenmesinin klinik overt diabete ilerlemesini önleyebildiği gösterilmiştir (109). Bu otoimmün diabet modellerinde düzenleyici immün hücrelerin upregülasyonu ve tedavi edilen farelerin pankreaslarında TH1 den TH2 lenfositlere shift olduğu gözlenmiştir (108,109). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ve analoglarının diğer spontan ve deneysel otoimmün ensefalomyeliti (110), sistemik lupus

eritematozusu (111), kollagenle indüklenen artriti (112), önleyebileceği gösterilmiştir. 1,25(OH)₂D₃ ve analoglarının nakil sonrası immünsupresyonda anlamlı faydaları olduğu gösterilmiştir (113,114). 1,25(OH)₂D₃ ve analoglarının etkinliği ve toksisitesi birçok fare ve rat transplant modelinde çalışılmıştır, kalp (115), karaciğer (116), ince barsak (115), deri (117), böbrek (113) pankreatik adacık (118) allograftlarında yaşam süresini uzattıkları, sadece akut değil kronik allograft rejeksiyonunu da inhibe ettikleri gösterilmiştir (113,119).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunun Seçimi

Bu çalışmaya Şubat ve Mart 2008 tarihlerinde, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara Hastanesi ve Etlik SSK Kadın Hastalıkları ve Doğum Hastanesinde doğan 101 bebek alındı. Gebelik haftası 38 hafta altında olan, gebelikte şüpheli enfeksiyon, erken membran rüptürü, korioamniyonit, preeklampsi, gestasyonel diabetes, koroner arter hastalığı, guatr vb. sorunları izlenen, plasenta ve bebekle ilgili intrauterin gelişme geriliği, perinatal asfiksi vb. sorunları olanlar çalışma dışı bırakıldı.

Bir anket formu oluşturularak annelere yaşları, öğrenim durumları, meslekleri, gebelik süresince vitamin takviyesi alıp almadıkları, günlük süt tüketimleri, giyinme tarzları, yaşadıkları evin güneş görüp görmediği, kaç kez gebe kaldıkları, kaç kez doğum yaptıklarının soruldu.

Çalışma için Başkent Üniversitesi Etik Kurulu ve Etlik SSK Kadın Hastalıkları ve Doğum Hastanesi Etik Kurulundan izin alındı. Çalışmaya katılan gebelerden laboratuvar analizleri için bilgilendirilmiş onam formu alındı. Doğum eylemi sırasında göbek kordonundan 25(OH)D vitamini düzeyi için antikoagulan içermeyen tüplere 4 cc tam kan; akım sitometrisi analizi ve tam kan sayımı için EDTA içeren tüplere toplam 5 cc kan alındı.

3.2. Laboratuvar Yöntemleri

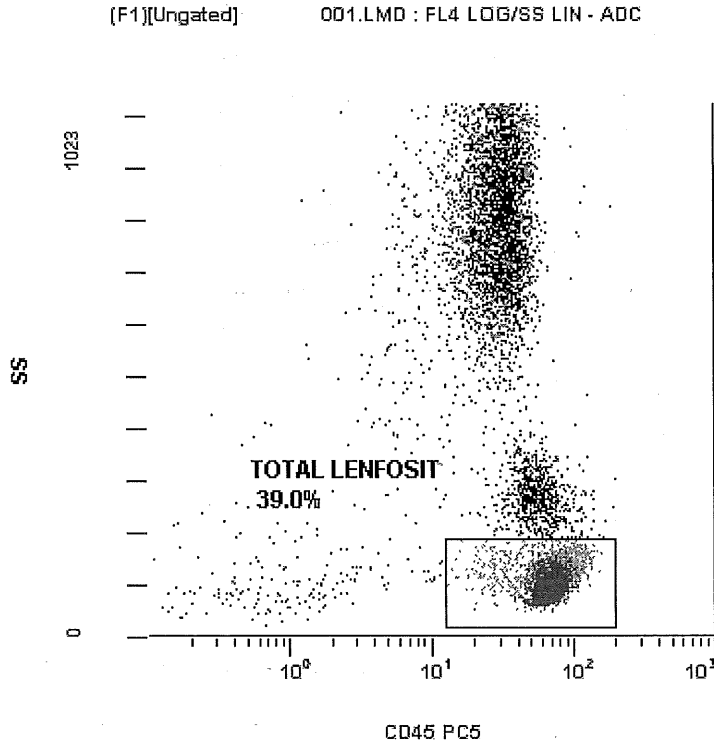
3.2.1.Monoklonal Antikorların Hazırlanması

Yüzey antijen boyaması amacıyla bir tüpe CD45 PC5, CD3 ECD, CD4 PE ve CD25 FITC monoklonal antikorları 10'ar μL eklendi. Tüm örneklerde lökosit sayısı, fosfatla tamponlanmış salin ile dilüsyon yapılarak $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ olacak şekilde ayarlandı. Monoklonal antikor içeren tüplere 100'er μL kan (5×10^5 hücre) eklendi. Tüpler hafifçe karıştırıldıktan sonra oda ısısında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildi. Süre sonunda tüplerin içerisine 2mL lizis solüsyonu eklendi ve 13 dakika inkübe edildi. Hazırlanan örnekler akım sitometri cihazında (Beckman Coulter; Coulter Epics XL- MCL, Marseille, France) okutuldu. Tüm monoklonal antikorlar Beckman Coulter (Marseille, France) firmasından temin edildi.

3.2.2.CD4/CD25 TREG analizi

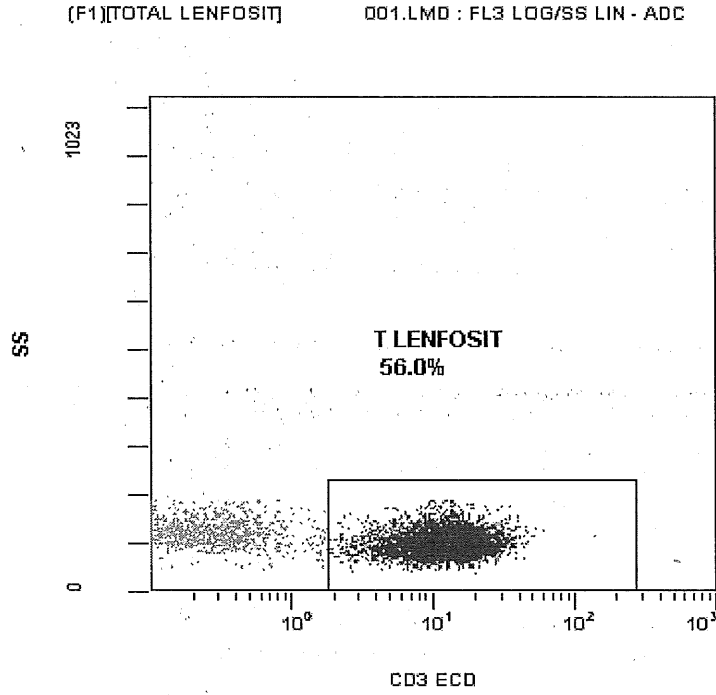
Analizler Beckman Coulter EXPO 32 ADC (Beckman Coulter, Marseille, France) software kullanılarak yapıldı.

CD45/SS grafiğinde lenfositler seçildi. (Şekil 3.1-A kapısı)



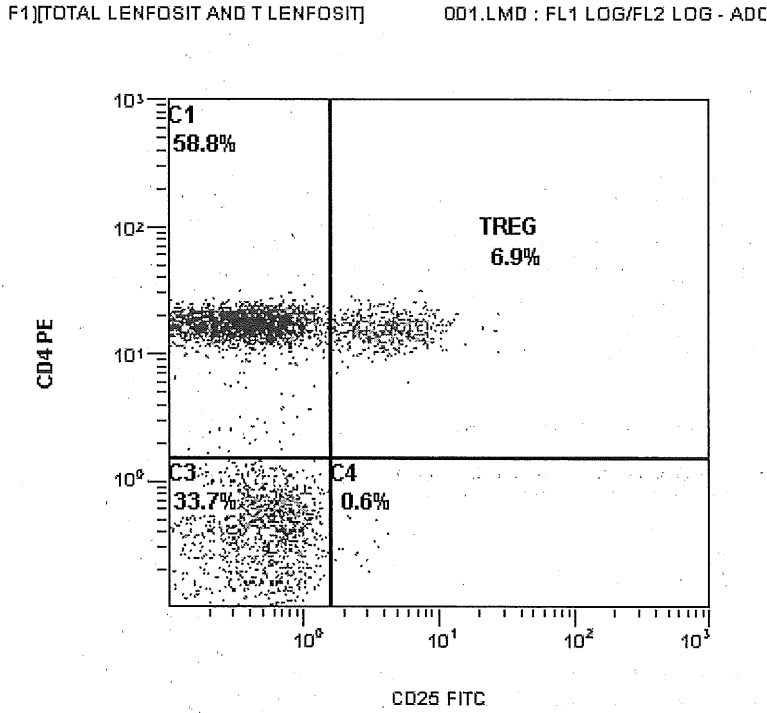
Şekil 3.1. A kapısı

A kapısındaki hücreler CD3/SS grafiğine tanıtılarak CD3 pozitif T lenfositler kapılandı
(Şekil 3.2.B kapısı)



Şekil 3.2. B Kapısı

B kapısındaki hücreler CD4/CD25 ikili grafiğine tanıtılarak ortak pozitif hücreler Treg hücresi olarak değerlendirildi ve yüzdesi tespit edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Treg yüzdesi

3.2.3.25(OH)D analizi

25(OH)D analizi HPLC sistemde uv detektör ile yapıldı (enjeksiyon hacmi: 50µl, akış hızı: 1,6ml/dk, dalga boyu:265 nm, kolon derecesi: ort.25 C).

3.3.İstatiksel Değerlendirme

Çalışmanın istatiksel analizi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda SPSS istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Kategorik değişkenlerin analizinde Pearson ki-kare testi ve Fisher-Exact test kullanıldı. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uyumu Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi ve normal dağıldıkları belirlendi. Bu nedenle sürekli değişkenlere ilişkin grupların karşılaştırılmasında T testi kullanıldı. Vitamin D düzeyleri ve T hücre alt tipleri ilişkisini değerlendirmek için Pearson korelasyon analizi yapıldı. $P < 0,05$ düzeyi istatiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veri setinin analizinde SPSS 14.0 istatistik paket programı kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamıza ilgili hastanelerde doğan 101 bebek alındı. Gebelerin ve yenidoğanların demografik özellikleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Gebelerin ve yenidoğanların demografik özellikleri

Demografik Özellikler		Yüzde (%)
Öğrenim Durumu	İlkokul	47,5
	Ortaokul	16,8
	Lise	23,8
	Önlisans	3,0
	Lisans	7,9
	Yüksek Lisans	1,0
Yaş	17-20	8,9
	21-30	69,3
	31-40	19,8
	41-50	2,0
Meslek	Çalışıyor	8,9
	Çalışmıyor	91,1
Vitamin Takviyesi	Alıyor	71
	Almıyor	29
Süt	İçmiyor	40,6
	>1 bardak	59,4
Giyinme	Geleneksel	79,2
	Modern	20,8
Ev Konumu	Güneşli	78,2
	Güneşsiz	20,8
Gebelik Sayısı	1	36,6
	2	35,6
	3	16,8
	4	9,9
	>4	1,1
Cinsiyet	Kız	42,0
	Erkek	58,0
Doğum Şekli	NSVY	58,4
	C/S	41,6
Akrabalık	Var	17,0
	Yok	83,0

Çalışmada ortalama doğum ağırlığı $3435,15 \pm 429,57$ (2700-4450) gr, ortalama gebelik haftası ise $39,41 \pm 1,08$ (38-42) olarak bulundu. Öğrenim durumlarına göre gebelerin % 47,5’i ilkokul, % 16,8’si ortaokul, % 23,8’ü lise, % 3’ü ön lisans, % 7,9’u lisans, % 1’i

yüksek lisans mezunu idi. %8,9'u 17-20 yaş aralığında, %69,3'ü 21-30 yaş aralığında, %19,8'i 31-40 yaş aralığında, %2'si 41-50 yaş aralığında idi. %91,1'i herhangi bir işte çalışıyor, %8,9'u çalışmıyordu. %71'si gebelikte Elevit Pronatal®, Folic Plus ® vb. vitamin takviyesi almış, %29'u almamıştı. %59,4'ü günde en az bir bardak süt içmiş, %40,6'sı hiç süt içmemişti. Giyinme şekli açısından hastaların %79,2'si uzun kollu, başları kapalı, ya da çarşafli iken %20,8'i modern giyinmekteydi. Gebelerin %20,8'i güneş görmeyen bir evde, %78,2'si güneşli bir evde yaşamakta idi. %91,1'i herhangi bir işte çalışıyor, %8,9'u çalışmıyordu. Hastaların çalışma sırasında %36,6'sının birinci gebeliği, %35,6'sının ikinci gebeliği, %16,8'inin üçüncü gebeliği, %9,9'nun dördüncü gebeliği, %1,1'inin altıncı gebeliği idi. Doğan bebeklerin %58'i kız, %42'si erkek cinsiyette idi. Doğum şekli göz önüne alındığında bebeklerin %58,4'ü normal spontan vajinal yolla, 41,6'sı C/S ile doğdu. Gebelerin %17'ünün eşleri ile arasında birinci derece akrabalık varken, %83'nün arasında akrabalık yoktu.

Tablo 4.2 de yenidoğanların T lenfosit, T helper ve Treg sayı ve yüzdelerinin ortalama ve standart sapması (SD) görülmektedir.

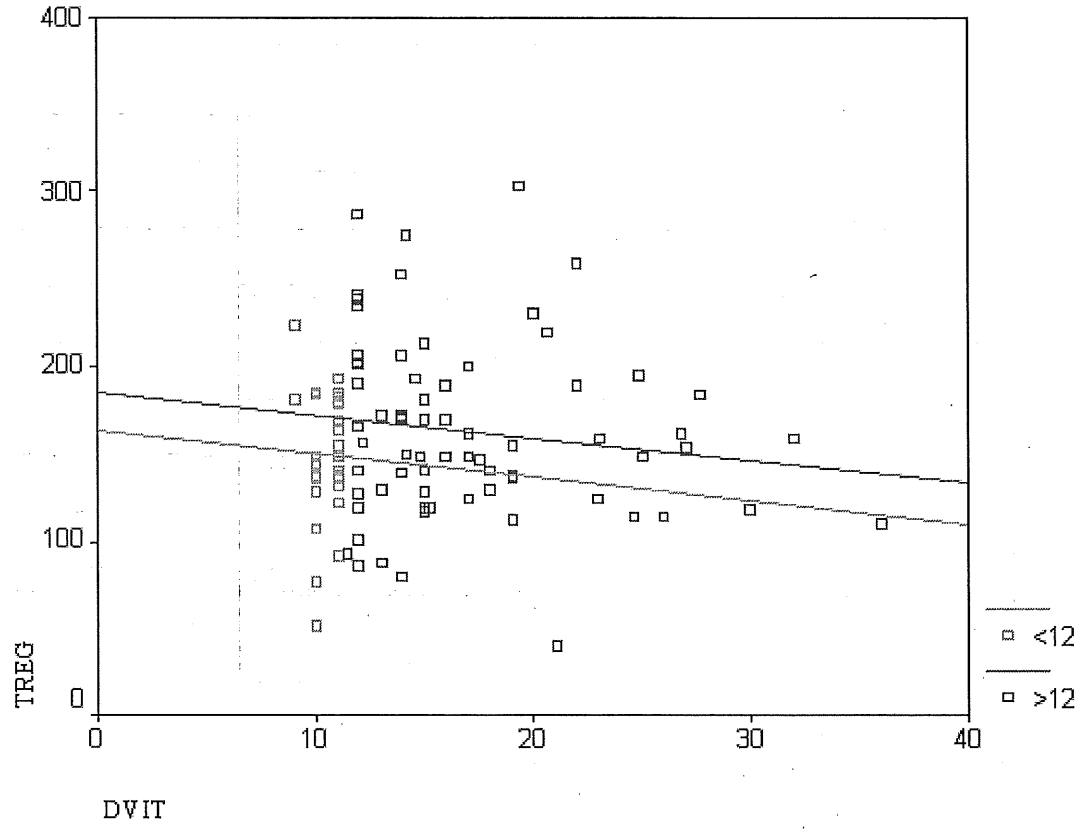
Tablo 4.2. Yenidoğanların T lenfosit, Thelper ve Treg sayı ve yüzdelerinin ortalama ve standart sapması (SD)

	Ortalama±SD (min-max)
Beyaz Küre Sayısı (/µl)	12842,38±3553,64 (5000-22200)
Total Lenfosit Yüzdesi(%)	30,52±6,84 (14.2-49.3)
Total Lenfosit Sayısı (/µl)	3842,52±1153,05 (1020-7630)
T Lenfosit Yüzdesi (%)	68,75±9,54 (40,5-89,5)
T Lenfosit Sayısı (/µl)	2611,98±755,24 (657-5264)
T Helper Yüzdesi (%)	70,29±7,28 (51.80-87,2)
T Helper Sayısı (/µl)	1829,07±563,40 (469-3659)
T Regülatör Yüzdesi (%)	6,23±1,33 (3.5-10,1)
T Regülatör Sayısı (/µl)	159,18±47,38 (40-303)

Çalışmamızda vitamin D düzeyleri ile ölçülen ve hesaplanan T hücre alt grupları arasında anlamlı korelasyon gösterilemedi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3.Vitamin D düzeyleri ile T lenfosit, T helper, Tregülatör hücre sayı ve yüzdelerinin korelasyonu

	Vitamin D düzeyi	
	Korelasyon	P
Beyaz küre sayısı	-0,135	0,178
Total lenfosit yüzdesi	0,051	0,615
Total lenfosit sayısı	-0,078	0,436
T lenfosit yüzdesi	-0,009	0,926
T lenfosit sayısı	-0,058	0,566
T helper yüzdesi	0,253	0,011
T helper sayısı	0,010	0,921
T regülatör yüzdesi	0,051	0,616



Şekil 4.1. Vitamin D düzeyi ile Treg sayısının serpmme çizimde gösterilmesi. < 12 ng/ml ve >12 ng/ml vitamin D düzeyleri için uygun lineer regresyon eğrisi yerleştirilmiştir.

Çalışmada yenidoğanlar, 25(OH)D>12 ng/ml ve 25(OH)D<12 ng/ml olarak 2 gruba ayrıldı. Gebelerin ve yenidoğanların demografik özellikleri Tablo 4. 4’de verilmiştir.

Tablo 4.4. Grup 1 ve 2’nin demografik özellikleri

Demografik Özellikler		grup 1 (n=69) (25(OH)D>12 ng/ml) Sayı(Yüzde)	grup 2 (n=32) (25(OH)D<12 ng/ml) Sayı(Yüzde)	P
Yaş	17-20	4 (%5,8)	5 (%15,6)	0,060
	21-30	50 (%72,5)	20 (%62,5)	
	31-40	15 (%21,7)	5 (%15,6)	
	41-50	-	2 (%6,3)	
Öğrenim durumu	İlkokul	33 (%47,8)	15 (%46,9)	0,105
	Ortaokul	7 (%10,1)	10 (%31,3)	
	Lise	19 (%27,5)	5 (15,6)	
	Önlisans	3 (%4,3)	-	
	Lisans	6 (%8,7)	2 (%6,3)	
	Yüksek Lisans	1 (%1,4)	-	
Meslek	Çalışmayan	62 (%89,9)	30 (%93,8)	0,523
	Çalışan	7 (%10,1)	2 (%6,3)	
Vitamin takviyesi	Almıyor	22 (%32,4)	7 (%21,9)	0,281
	Alıyor	46 (%67,6)	25 (%78,1)	
Süt	İçmiyor	38 (%55,1)	22 (%68,8)	0,193
	> 1 bardak	31 (%44,9)	10 (%31,3)	
Giyinme	Geleneksel	54 (%78,3)	26 (%81,3)	0,731
	Modern	15 (%21,7)	6 (%18,8)	
Ev Konumu	Güneşsiz	17 (%24,6)	4 (%12,5)	0,140
	Güneşli	52 (%75,4)	27 (%84,4)	
Gebelik Sayısı	1	27 (%39,1)	10 (%31,3)	0,605
	2	25 (%36,2)	11 (%34,4)	
	3	9 (%13,0)	8 (%25,0)	
	4	7 (%10,1)	3 (%9,4)	
	>4	1 (%1,4)	-	
Cinsiyet	Kız	32 (%46,4)	10 (%32,3)	0,186
	Erkek	37 (%53,6)	22(%67,7)	

Ağır vitamin D eksikliği olan ve olmayan grubun ortalama gebelik haftası 39±1 hafta, ortalama doğum ağırlığı ise sırasıyla 3384,78±423,076 ve 3543,75±429,88 gr olarak bulundu. Gruplar arasında gebelik haftası ve doğum ağırlığı açısından anlamlı farklılık

izlenmedi. Ağır vitamin D eksikliği olan ve olmayan grup karşılaştırıldığında öğrenim durumu, meslek, vitamin takviyesi alıp almama, vitamin D ile beslenme şekli, giyinme tarzı, ev konumu, gebelik sayısı ve bebeklerin cinsiyeti açısından anlamlı bir fark gözlenmedi.

Her iki gruptaki yenidoğanların 25(OH)D düzeyleri ve lenfosit alt gruplarının karşılaştırılması Tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.5. Gruplardaki yenidoğanların 25(OH)D düzeyleri ve T lenfosit, T Helper ve T regülatör hücre, sayı ve yüzdelerinin karşılaştırılması

	Grup 1 (n=69) (25(OH)D>12 ng/ml)	Grup 2(n=32) (25(OH)D<12 ng/ml)	P
Beyazküre sayısı(/ μ l)	13108 $\pm$ 3486	12272 $\pm$ 3688	0,274
Total lenfosit yüzdesi(%)	31 $\pm$ 6,6	29,9 $\pm$ 7,5	0,580
Total lenfosit sayısı(/ μ l)	3975 $\pm$ 1161	35559 $\pm$ 1102	0,092
T lenfosit yüzdesi(%)	68,3 $\pm$ 10,3	69,5 $\pm$ 7,7	0,573
T lenfosit sayısı(/ μ l)	2687 $\pm$ 772	2451 $\pm$ 703	0,144
Thelper yüzdesi(%)	87,2 $\pm$ 70,1	68,6 $\pm$ 6,8	0,107
Thelper sayısı(/ μ l)	1898 $\pm$ 577	1683 $\pm$ 513	0,075
Tregülator yüzdesi(%)	6,3 $\pm$ 1,4	6,3 $\pm$ 1,2	0,832
Tregülator sayısı(/ μ l)	164 $\pm$ 52	150 $\pm$ 36	0,158

Gruplar arasında vitamin D düzeyleri, beyaz küre sayıları, total lenfosit yüzdesi, total lenfosit sayısı, T lenfosit yüzde ve sayısı, T helper yüzde ve sayısı, Treg yüzde ve sayısı açısından anlamlı fark gözlenmedi. Gebelik haftası, cinsiyet ve doğum ağırlıkları lenfosit alt grupları ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir korelasyon gözlenmedi.

5.TARTIŞMA

Vitamin D inflamatuvar yanıtların kontrolünde önemli role sahiptir. Bu fonksiyonlara aracılık eden en önemli hücre grubu düzenleyici T hücrelerdir. Erişkin ve hayvan modeli çalışmalarında vitamin D eksikliğinde, Treglerin rol aldığı, immün fonksiyon bozukluğu ile giden hastalıklar geniş çapta çalışılmıştır (34,35,38,39). Yenidoğan ve süt çocukluğu döneminde inflamasyonla giden ve Treglerin rol aldığı hastalıklarda (atopik egzema, inek sütü alerjisi, hışıltılı çocuk, sepsis vb.) D vitamini eksikliği gösterilmiştir (19,20) ; ancak Treg ve vitamin D düzeyi ilişkisi çalışılmamıştır. Bu çalışmada kord kanı vitamin D düzeyi ve eş zamanlı Treg sayı ve yüzdesi çalışıldı. Ağır vitamin D eksikliği [25(OH)D] <12 ng/ml olarak kabul edildi. Çalışmamızda vitamin D düzeyi <12 ng/ml olan yenidoğan grubu ile >12 ng/ml olan grup arasında düzenleyici T hücre sayı ve yüzdesi farklı bulunmadı.

Vitamin D eksikliğinde görülen rikets, halen birçok ülkede toplum sağlığını ilgilendiren önemli bir sağlık problemidir. Vitamin D eksikliğine neden olan faktörler, vitamin D desteği yapılmadan sadece uzamış anne sütü ile beslenme, maternal vitamin D eksikliği, yanlış beslenme alışkanlıkları, ılıman iklimlerde yaşama, güneş ışınlarına maruziyet eksikliği, koyu cilt rengine sahip olmadır (2,3,4). Serum 25(OH)D düzeyi ağır vitamin D eksikliğini tanımlamada en iyi belirteçdir, doku vitamin durumunu gösteren en iyi göstergedir (24). Yeterli ve yetersiz vitamin D düzeyi arasındaki sınır çizgisi açık olarak tanımlanmamıştır. Birçok vitamin D çalışmasında vitamin D esikliği için cut-off 10 ve 12 ng/ml arasında değişmektedir (25,120,121). Bazı çalışmalarda ise paratiroid hormonu normal sınırının üzerine çıkaran 25(OH)D düzeyleri hipovitaminoz D olarak tanımlanmaktadır, bu düzey sırasıyla 25 ve 22 ng/ml olarak kabul edilmiştir (122,123). Çalışmamızda 101 hasta içinde 25(OH)D düzeyi 25 ng/ml üstünde olan sadece 7 hasta vardı. Bu çalışmada ağır vitamin D eksikliği 12 ng/ml'nin altındaki değerler olarak kabul edildi. 101 hastanın 32'sinde yani %31'inde vitamin D eksikliği saptandı. Alok Sachan ve ark. ları Kuzey Hindistan'da yaptıkları bir çalışmada 117 kord kanında vitamin D düzeyini ortalama 8,4+/-5,7 ng/ml bulmuşlar ve yenidoğanların %95,7'sinde vitamin D hipovitaminozu saptamışlardır (serum 25(OH)D<20 ng/ml). Yine bu çalışmada hastalar kırsal ve kentsel kesimde yaşayanlar olarak ayrıldıklarında her iki grup arasında gebelerin vitamin D düzeyleri açısından anlamlı bir fark gözlenmemiş ve kord kanı 25(OH)D düzeyleri, annenin değerleriyle güçlü olarak korele bulunmuştur (123). Yunanistanda

yapılan başka bir çalışmada, doğum eylemi sırasında 123 gebeden ve bebekten kord kanı alınmış, anne ve bebek 25(OH)D düzeyleri arasında güçlü korelasyon saptanmıştır (124). Bu çalışmada vitamin D eksikliği için cut-off değeri <10 ng/ml olarak alınmıştır, annelerin %19,5'inde ve yenidoğanların %8,1'inde hipovitaminoz D saptanmıştır ve bu sonuçlar bizim çalışmamızın sonuçlarımıza yakındır. Buradan Türkiye ve Yunanistan gibi Akdeniz ülkelerinde bile perinatal dönemde güneş ışığına maruziyetin vitamin D ihtiyaçlarını karşılamada yetersiz olduğu sonucu çıkarılabilir.

Çalışmamızda ağır vitamin D eksikliği olan ve olmayan yenidoğanların anneleri yaşlarına göre karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Kuveytte anne ve yenidoğanlarında vitamin D durumunu belirlemek için yapılan bir çalışmada, 214 gebenin %40'ında doğum sırasında vitamin D eksikliği gözlenmiş, bunların ortalama yaş aralığı 26,8-28,6 bulunmuştur (2). Buradan normalde ileri anne yaşlarında görülmesi beklenen vitamin D eksikliğinin 20'li yaşlarda bile gözlenmesi, gebenin yaşının onun vitamin D düzeyini dolayısıyla yenidoğan bebeğin vitamin D düzeyini etkileyen önemli bir faktör olmadığı sonucu çıkarılabilir.

Amerika Ulusal Bilim Akademisi gebelikte diyetle referans vitamin D alımını 400 IU olarak önermektedir. Gebelikte ve laktasyon döneminde vitamin D suplementasyonu ile yakın geçmişte Cochrane Library'de klinik farklı sonuç veren çalışmalar yer almasına rağmen (123), bugün için en son çalışmalar bu dönemlerde diyetle olması gereken vitamin D içeriğinin 6000 IU/gün seviyelerinde olması gerektiğini göstermektedir (125). Londra'da Yu CK ve ark. ları gebelikteki vitamin D durumunu belirlemek ve günlük ve tek doz vitamin D suplementasyonunun etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmalarında Indian Asian, Ortadoğu, siyah ve beyaz ırktan 27. gebelik haftasındaki 180 gebeyi 3 tedavi grubuna randomize etmişlerdir. Bir gruba tek doz oral 200,000 IU vitamin D, ikinci gruba doğuma kadar günlük 800 IU vitamin D verilmiş, 3. gruba ise tedavi verilmemiştir. Sonuçta suplemante edilen gruplarda maternal 25(OH)D düzeylerini anlamlı olarak daha yüksek saptamışlardır. Kord düzeyleri de anlamlı olarak suplementasyonla artmıştır. Sonuçta tek veya günlük doz tedavinin 25(OH)D düzeylerini anlamlı olarak iyileştirdiği gözlenmiştir. Buna rağmen bu çalışmada suplementasyonla bile ancak küçük bir anne ve bebek yüzdesi vitamin D açısından yeterli bulunmuştur (126). Biz ise çalışmamızda vitamin D düzeyi >12 ng/ml ile >12 ng/ml olan gruplarda, gebelikte vitamin preparatı kullanımı açısından anlamlı bir fark gözlemedik. Çalışmaya katılan hasta grubunun eğitim

ve öğrenim düzeyinin düşük olduğu sonucu göz önüne alındığında, gebeliğinde vitamin preparatı kullandığını ifade eden grubun, düzenli ilaç kullanmamış olabileceği sonucu çıkarılabilir.

Türkiye’de üreme çağındaki peçeli ve peçesiz kadınlar arasında vitamin D durumunu ve kemik mineral dansitesini karşılaştırmak için yapılan bir çalışmada 30 gönüllü peçeli kadın, 30 batılı giyim tarzına sahip kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. İki grubun diyet alışkanlıkları, vücut kitle indeksi dağılımları ve gebelik öyküleri benzer nitelikte bulunmuştur. Peçeli gruptaki bayanların eğitim seviyeleri daha düşük bulunmuştur ($p<0,001$). 25(OH)D düzeyleri güneş ışığına maruziyet ile pozitif korele, kapalı giyinmenin süresi ile negatif korele bulunmuştur. Kapalı giyinen kadınların hiçbirinde vitamin D yetersizliği saptanmamıştır ama bunların ortalama 25(OH)D düzeyleri ($33,1 \pm 16$ ng/ml), kontrol grubuna göre ($53,9 \pm 27,3$ ng/ml) düşük bulunmuştur (127). Vitamin D₃ deride güneş ışınları ile 7-dehidrokolesterolden elde edilir ve günlük gereksinimin %90-95’ini karşılar. 290-315 dalga boyundaki ultraviyole B güneş ışınları ile 7 – dehidrokolesterol önce previtamin D₃’e dönüştürülür. Daha sonra izomerizasyon ile previtamin D₃ den vitamin D₃ oluşur (8, 21). Vitamin D’nin deride sentezi 25(OH)D’nin ana kaynağıdır ve bu da ihtiyaçları karşılamak için yeterli değildir. Kapalı giyinen ya da koyu tenli olan annelerin bebekleri, doğumda vitamin D eksikliği açısından önemli risk altındadırlar (2). Hollanda da koyu tenli olma veya kapalı (peçe vb.) giyinme tarzı gibi vitamin D eksikliğinin risk faktörleri olan gebelerin bebeklerinde, vitamin D eksikliğinin prevalansını belirlemek için yapılan bir çalışmada, risk grubunu 166 koyu tenli ve /veya kapalı giyinen anne bebeği, kontrol grubunu ise açık tenliler oluşturmuştur. Sonuçta her iki grup arasında infantlarda kordda vitamin D eksikliği prevalansı istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (%63,3 vs %15,8; $p<0,001$). Bu çalışmada da yine benzer çalışmalarda (2) olduğu gibi anne serumundaki ve kordaki 25(OH)D düzeylerinin güçlü olarak korele olduğu gösterilmiştir (127). Çalışmamızda geleneksel ve modern giyinen gebelerin bebeklerinde vitamin D düzeyini farklı bulmadık

Kemik gelişimi fetal hayat sırasında başlar ve kalsiyum ve vitamin D’ye gereksinim duyar. Gebelikte kalsiyum kemik gelişimini sağlamak için aktif olarak plasentadan geçerken, 25(OH)D plasentadan pasif olarak geçer ve yenidoğanın vitamin D metabolizmasını başlatmak için fetüste depolanır (124). Bu yüzden annenin özellikle son trimesterdaki vitamin depoları, anne sütü vitamin D den fakir olduğu için (128,129) infantın ana vitamin

D kaynağıdır. Vitamin D doğada sadece birkaç besinde bulunduğu için maternal düzeyleri asıl olarak güneş ışığına maruziyete ve vitamin D suplementasyonuna bağlıdır (130). Hollandada Hague da farklı etnik gruplardaki gebelerde vitamin D eksikliğinin prevalansını belirlemek için yapılan bir çalışmada, 12. gebelik haftasında 353 gebe kadında serum 25(OH)D düzeylerine bakılmıştır. Ortalama serum 25(OH)D düzeyleri Türk kadınlarda (15,2 $\pm$ 12,1 nmol/l), Moroccan (20,1 $\pm$ 13,5 nmol/l) ve diğer batılı olmayan kadınlarda (26,3 $\pm$ 25,9 nmol/l), batılı bayanlara (52,7 $\pm$ 21,6 nmol/l) göre anlamlı olarak ($p \leq 0,001$) düşük bulunmuştur. Serum 25(OH)D düzeyleri %22 Türk gebede laboratuvar tespit limitinin altında bulunmuştur. Etnik gruplar arasındaki farklılıklar parite, yaş, mevsim, alkol, ilaç, sigara kullanımı veya enfeksiyon hastalıkları gibi diğer belirleyicilerden bağımsız bulunmuştur (126). Çalışmamızda annelerin gebelik sayıları arttıkça bebeklerin vitamin D düzeylerinde azalma saptamadık.

Vitamin D'nin deride sentezi 25(OH)D'nin ana kaynağıdır ve bu da ihtiyaçları karşılamak için yeterli değildir, diyetle de yeterli miktarda alınması lazımdır. Vitamin D diyetle yağlı balıklar, balık yağları, karaciğer ve yumurta sarısı gibi az sayıda besinin içinde bulunur. Yiyeceklerde vitamin D suplementasyonunun rutin olduğu ülkelerde, günlük diyetle uygun oranlarda vitamin D konsantrasyonları bulunabilir. Türkiye'de besinler vitamin D açısından güçlendirilmediği için çalışmamızda diyetinde yeterli miktarda süt tüketen ve tüketmediğini ifade eden gebelerin bebeklerinde 25(OH)D düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmamıştır.

Fujisawa Y ve arklarının normal insanlarda vitamin D metabolizması ve ilişkili hormonların, immünreaktif PTH ve kalsitoninin yaş-ilişkili değişikliklerini tanımlamak için yaptıkları çalışmada serum 25-hidroksivitamin D, 24,25-dihidroksivitamin D, veya vitamin D bağlayıcı protein düzeylerinin yaşla ilişkili olarak çocuklarda, genç erişkin ve yaşlılarda anlamlı olarak değişmediğini, kord serumunda tüm vitamin D metabolitlerinin ve vitamin D bağlayıcı protein düzeylerinin çocuk ve genç erişkinlerden anlamlı olarak düşük olduğu ($p < 0,01$) görülmüştür. Kalsiyum, fosfor, vitamin D metabolitleri, immünreaktif PTH ve kalsitoninin serum konsantrasyonlarının cinsiyete göre farklılık göstermediği gözlenmiştir (130). Bizim çalışmamızda kız ve erkek yenidoğanlar arasında vitamin D düzeyleri açısından anlamlı fark bulamadık.

1 α 25-dihidroksivitamin D (1 α 25(OH)2D) vitamin D'nin en potent metabolitidir ve etkisini 1 α 25(OH)2D reseptörü (VDR) üzerinden gösterir (5-7). [1 α 25(OH)2D] vitamin

D'nin prekürsörü olan 25(OH)D'den sentezini mitokondrial sitokrom P450 enzimi olan 25-hidroksivitamin D -1 α -hidroksilaz veya CYP27B1 tarafından katalizlenir. Dibyendu K. ve ark. ları 1 α -hidroksilaz geninin hormon ve hem bağlayıcı domainlerini ablasyona uğratıp 1 α -hidroksilaz'dan yoksun fare modeli geliştirmişlerdir. Bunun sonucunda farede, insanlarda görülen vitamin D bağımlı rikets tip-1(VDDR-1) karakteristikleri olan hipokalsemi, sekonder hiperparatiroidizm, gelişme geriliği, iskelet anormallikleri gözlenmiştir. Ayrıca null mutant farede vahşi tip fareye göre periferik CD4+(p<0.01), CD8+(p<0.02) ve CD4-CD8- T lenfosit (p<0.005) populasyonlarında düşüklük saptanmıştır (131). Vitamin D reseptör knockout (VDR-KO) farede in vitro ve in vivo analizlerinin yapıldığı bir başka çalışmada ise, vahşi tip ile karşılaştırıldığında periferik kan lökositleri veya lenfoid organların hücresel kompozisyonları arasında fark bulunmamıştır. VDR-KO fare ve vahşi tip farelerin periferik kan, dalak, timus, kemik iliği ve lenf nodlarında, T hücreleri, CD4+T hücreleri, CD8+T hücreleri, B lenfositler, NK hücreler veya monositik hücreler açısından eşit dağılımlar gözlenmiştir (132). Vitamin D bağımlı rikets, artmış enfeksiyon riski ile ilişkilidir ve bu hastalıkta immün sistemde değişiklikler raporlanmıştır (148). Çakmak FN ve ark. larının 6-24 ay arasında olan 18 vitamin D bağımlı riketsi olan süt çocuğunda yaptıkları çalışmada, kontrol grubuna göre rikets grubunda CD4+ hücre sayı ve yüzdesini, CD8+ hücre sayı ve yüzdesini, CD4+/CD8+ oranını anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (133). Çalışmamızda vitamin D düzeyi <12 ng/ml olan yenidoğan grubu ile >12 ng/ml olan grup arasında T hücre, T helper ve düzenleyici T hücre sayı ve yüzdesi farklı bulunmadı. Conny Gysemans ve ark. ları fonksiyonel VDR'si olmayan diabetik farelerde bu farelerde regülör CD4+CD25+ T hücreleri dalak, mezenterik lenf nodları ve timusta daha düşük olarak saptamışlardır (134). Hasta grubumuzun tamamına yakınının <25 olması bu farkı göstermemizi engellemiş olabilir. Ancak tüm grupta da vitamin D düzeyleri ile T hücre sayı ve yüzdesi arasında korelasyon saptanmadı. Doğal oluşan Tregler dolaşan CD4+T hücrelerin %1-5'ini oluşturmaktadır (153). Çalışmamızda kord kanında Treg oranı ortalama %6,23+/- 1,33 olarak bulundu. Tang J ve ark. ları CD4+CD25+ Treg hücrelerin kord kanında miktarını belirlemek için yaptıkları çalışmada, 15 yenidoğan kord kanında Treg oranını %3,86+/- %1,63 oranında bulmuşlardır (135). Wan Fai Ng ve ark. ları CD4+CD25+ T hücrelerinin fenotip ve davranışlarını yenidoğan ve erişkinlerde karşılaştırdıkları çalışmalarında, CD4+ T hücrelerinin %5- %15'inin CD25 ifade ettiğini göstermişlerdir (154).

İmmünolojik hücre sayı ve fonksiyonu üzerinde cinsiyet ve yaş farklılıkları hem sağlıklı hem de hasta kişiler üzerinde gözlenmiştir. Farklı yaş grupları için sağlıklı çocuklarda kan lenfosit subset subpopülasyon ölçümleri raporlanmıştır (136-137). Adolesan ve erişkin flow sitometri çalışmaları ile yaş ve cinsiyetteki immün hücre farklılıkları gösterilmiştir (138-139). Bret ve ark. ları 2 yıllık sürede seksüel olarak aktif, HIV negatif adolesanlarda lenfosit subset markerlarının flow sitometrik analizlerini yapmışlardır. Irk, cinsiyet ve yaş arasında cinsiyetin lenfosit subset ölçümlerinde farklılıklarla en sık ilişkili demografik özellik olduğunu belirtmişlerdir. Kızlarda erkeklere göre total CD4+ T hücrelerin, CD4+ hafıza T lenfositlerin daha yüksek, CD16+ T lenfositlerin daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada CD8+ ve CD19+ sayısındaki cinsiyet farklılıkları ırk ve yaş etkisi de göz önüne alındığında gözlemlenmiştir (138). İmmün hücre sayılarındaki bu farklılıklar androgen, östrojen veya her ikisindeki farklılıklara bağlı olabilir. Cinsiyet immün sistemi birçok düzeyde etkiliyor olabilir. Cinsiyetin B ve T hücre yanıtları üzerine, sitokin ve kemokinlerin sekresyonu üzerine etkisi bulunmaktadır (142). Hücre proliferasyonu sitokinlerin etkisi altında gerçekleşir ve T hücre sayılarındaki kız ve erkeklerde görülen farklılıklar sitokin düzenlenmesindeki farklılıklarla ilişkili olabilir (138). Sex hormonları immün hücre popülasyonlarını etkiliyor olabilir. Castrated farelerde yapılan çalışmalarda hem CD4+ hem CD8+ T hücrelerin sayılarının arttığı gözlenmiştir (145). İmmün sistem üzerinde cinsiyetin etkisi immün sistem hastalıklarının özellikle otoimmün hastalıkların cinsiyet farklılığı göstermesinden anlaşılabılır. Sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit, myastenia gravis ve Hashimoto hastalığı gibi birçok hastalığın prevelansı bayanlarda daha fazladır (146). Rukia S.Kibaya ve ark. larının Kenyada 1293 HIV-seronegatif 18-55 yaş aralığında katılımcıda klinik laboratuvarlar için referans aralık belirlemek için yaptıkları çalışmada, kadın ve erkek cinsiyet arasında beyaz küre sayısı, total lenfosit sayı ve yüzdesi arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada grubun lenfosit subset analizleri sonucunda CD3+T hücre sayı ve yüzdesi, CD4+T hücre sayı ve yüzdesi, CD8+T hücre sayı ve yüzdesi, CD4/CD8 oranı kadın ve erkek cinsiyet arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Asyada, sağlıklı popülasyonda lenfosit alt gruplarında doğumdan erişkin döneme olan cinsiyete bağlı değişikliklerin araştırılışı bir başka çalışmada ise, kız ve erkek cinsiyet arasında doğumda kord kanında total beyaz küre sayısı ve yüzdesi, total lenfosit sayı ve yüzdesi, T lenfosit sayı ve yüzdesi açısından anlamlı fark gözlenmemiştir. Aynı çalışmada sadece CD4 alt grubu kord kanında kızlarda anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (147). Bu çalışmada cinsiyet ile lenfosit alt grupları sayı ve yüzdesi arasında korelasyon gözlemedik.

Çalışmamızda erkek ve kız cinsiyetler arasında Treg sayı ve yüzdesinde farklılık gözlemedik. Östrojen, FoxP3 mRNA'sının ekspresyonunu düzenler (143). Jay Reddy ve ark. ları doğal oluşan CD4+CD25+ Treg hücrelerin fonksiyonlarının cinsiyete göre farklılık gösterebileceğini göstermek için yaptıkları çalışmalarında B10.S farelerin Treg hücrelerini in vivo olarak CD25 antikor kullanarak baskılamışlardır ve her iki cinsiyette deneysel otoimmün ensefalomyelit oluşturmuşlardır. Sonuçta Treglerin yüzdesini erkek farelerde daha düşük olarak bulmuşlardır (144).

Bu çalışmada ağır vitamin D eksikliği olan yenidoğan grubunda Treg sayısı ve yüzdesi çalışıldı. Çalışma grubumuzda yüksek oranda vitamin D eksikliği görüldü. Ancak ağır vitamin D eksikliği olan grupta Treg sayı ve yüzdesi farklı bulunmadı. Bu sonucun klinik önemi, ağır vitamin D eksikliği olan çalışma grubunun; büyüme, nörolojik gelişim ve alerjik hastalıklar açısından izlemi sonucunda ortaya çıkacaktır.

Bu çalışma, term, sağlıklı, antenatal ve perinatal riski olmayan yenidoğan grubunda yapılmıştır. Son birkaç yılda gebelikte saptanan Vitamin D eksikliğinin preeklampsi ve gestasyonel diabetes görülme sıklığını artırdığı bildirilmiştir (149,150). Hatta eksiklik olan grupta vitamin D tedavisi ile preeklampsinin önlenebileceğine dair yayınlar vardır (151,152). Yenidoğan morbiditesini ve mortalitesini de etkileyebilecek bu yaklaşımlar, özellikle giyim ve yaşam koşulları bizim gibi olan ülkelerde, toplum sağlığı açısından da çok önemlidir. Bu nedenle antenatal, perinatal riskleri olan gebelerde de vitamin D eksikliğinin, kordon kanı vitamin D, Treg hücre, yenidoğan ve bebeklik dönemi morbidite ve mortalitesine etkisi araştırılmalıdır.

6.SONUÇLAR

1. Öğrenim durumlarına göre gebelerin % 47,5'i ilkokokul, % 16,8'i ortaokul, % 23,8'i lise, % 3'ü ön lisans, % 7,9'u lisans, % 1'i yüksek lisans mezunu idi.
2. Gebelerin %8,9'u 17-20 yaş aralığında, %69,3'ü 21-30 yaş aralığında, %19,8'i 31-40 yaş aralığında, %2'si 41-50 yaş aralığında idi.
3. Gebelerin % 91,1'i herhangi bir işte çalışıyor, % 8,9'u çalışmıyordu.
4. Gebelerin % 71'si gebelikte vitamin takviyesi almış, % 29'u almamıştı.
5. Gebelerin % 59,4'ü günde en az bir bardak süt içmiş, % 40,6'sı hiç süt içmemişti.
6. Giyinme şekli açısından gebelerin % 79,2'si uzun kollu, başları kapalı, ya da çarşafı iken % 20,8'i modern giyinmekteydi.
7. Gebelerin % 20,8'i güneş görmeyen bir evde, % 78,2'si güneşli bir evde yaşamakta idi.
8. Annelerin çalışma sırasında %36,6'sının birinci gebeliği, %35,6'sının ikinci gebeliği, %16,8'inin üçüncü gebeliği, %9,9'nun 4'üncü gebeliği, %1,1'inin 6. gebeliği idi.
9. Doğan bebeklerin %58'i erkek, %42'si kız cinsiyette idi.
10. Doğum şekli göz önüne alındığında bebeklerin %58,4'ü normal spontan vajinal yolla, 41,6'sı C/S ile doğdu.
11. Gebelerin %17'sinin eşleri ile arasında birinci derece akrabalık varken, %83'ünün arasında akrabalık yoktu.
12. Ağır vitamin D eksikliği olan (25(OH)D<12 ng/ml) ve 25(OH)D düzeyi >12 grup karşılaştırıldığında annenin öğrenim durumu, mesleği, vitamin takviyesi alıp almaması, vitamin D ile beslenme şekli, giyinme tarzı, ev konumu, gebelik sayısı ve bebeklerin cinsiyeti açısından anlamlı bir fark gözlenmedi.
13. Gebelik haftası, cinsiyet ve doğum ağırlıkları ile lenfosit alt grupları arasında korelasyon gözlenmedi.

14. Vitamin D düzeyi ile lenfosit alt gruplarının sayı ve yüzdesi arasında korelasyon gözlenmedi.

15. Ağır vitamin D eksikliği olan ($25(\text{OH})\text{D} < 12 \text{ ng/ml}$) ve $25(\text{OH})\text{D} > 12$ olan grup arasında, beyaz küre sayıları, total lenfosit yüzdesi, total lenfosit sayısı, T lenfosit yüzde ve sayısı, T helper yüzde ve sayısı, Treg yüzde ve sayısı açısından anlamlı fark gözlenmedi.

7. KAYNAKLAR

1. Panichi V, Migliori M, Taccola D, Consani C, Giovanni L. Effects of calcitriol on the immune system. *Clinical and Experimental Pharmacology* 2003;30:807-811
2. Molla AM, Badawi MH, Al –Yaish S, Sharma P, el-Salam RS. Risk factors for nutritional rickets in children in Kuwait. *Pediatr Int* 2000;42:280-284
3. Bassir M, Laborie S, Lapillonne A, Claris O, Chappuis MC, Salle BL. Vitamin D deficiency in Iranian mothers and their neonates: a pilot study. *Acta Paediatr* 2001; 90:577-579
4. Alagol F, Shihadeh Y, Boztepe H, Tanakol R, Yarman S, Azizlerli H, Sandalci O. Sunlight exposure and vitamin D deficiency in Turkish women. *J Endocrinol Invest* 2000;23:173-177
5. DeLuca HF & Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB Journal* 2001;15:2579-2585
6. Nemere I & Farach-Carson MC. Membrane receptors for steroid hormones: A case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998;248:442-449
7. Norman AW. Receptors for 1,alfa -25(OH)2D3: Past, present and future. *Journal of Bone and Research* 1998;13:1360-1369
8. Dursun A. D vitaminin kemik metabolizması dışındaki etkileri. *Katkı Pediatri Dergisi* 2006;28:225-234
9. C.Mathieu, L.Andorini. The coming of age 1,25-dihydroxyvitamin D3 analogs as immunomodulator agents. *Trends Mol. Med* 2002;8:174-179
10. Furtado GC, Olivares-Villagomez D, Curotto de Lafaille MA, Wensky AK, Latkowski JA, Lafaille JJ. Regulatory T cells in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Rev* 2001;182:122-134.
11. Hori S, Haury M, Lafaille JJ, Demengeot J, Coutinho A. Peripheral expansion of thymus-derived regulatory cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Eur J Immunol* 2002;32:3729-3735.
12. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002;169:4712-6
13. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000;192:295-302.

14. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998;160:1212-1218.
15. Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med* 2002;195:1641-1646.
16. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2002;196:401-406.
17. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002;99:3493-3499.
18. Szegedi A, Baráth S, Nagy G, Szodoray P, Gál M, Sipka S, Bagdi E, Banham AH, Krenács L. Regulatory T cells in atopic dermatitis: epidermal dendritic cell clusters may contribute to their local expansion. *Br J Dermatol* 2009 Feb 12.[Epub ahead of print].
19. Karlsson MR, Rugtveit J, Brand Zaeg P. Allergen responsive CD4+CD25+ reg T cells in children who have outgrown cow' s milk allergy. *J Exp Med* 2004;199:1679-1688
20. S.Gregori, M.Casorati, S.Amuchastegui, S.Smiroldo, A.M. Davalli, L. Adorini. Regulatory T cells induced by 1alfa, 25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J. Immunol* 2001;167(4):1945-1953.
21. Zittermann A.Vitamin D in preventive medicine are we ignoring the evidence? *British Journal of Nutrition* 2003;89:552-572
22. Holick MF. McColum Award Lecture, Vitamin D: New horizons for the 21st century. *American Journal of Clinical Nutrition* 1994;60:619-630
23. Mark L. Stroud, Stilgoe Simon, Stott E Valerie. Vitamin D: A review. *Australian Family Physician* 2008;37:1002-1005
24. Mc Kenna MJ & Freaney R. Secondary hyperparathyroidisms in the elderly: means to defining hypovitaminosis D. *Osteoporosis international* 1998;S3- S6
25. Ladhani S, Srinivasan L, Buchanan C, Allogrove J. Presentation of vitamin D deficiency. *Arh Dis Child* 2004;89:781-784
26. Lips P, Chapuy MC, Dawson –Hughes B, Pols HAP, Holick MF. An international comparison of serum 25-hidroksi vitamin D measurements. *Osteoporosis Int* 1999;9: 394-397
27. Rajakumar K. Vitamin d, cold liver oil, sunlight, and rickets: a historical perspective. *Pediatrics* 2003;112. e132-135

28. Molla AM, Badawi MA, Hammound MS, Molla AM, Shukkur M, Thalib L, Eliwa MS. Vitamin D status of mothers and their neonates in Kuwait. *Pediatrics International* 2005;4:649-652
29. Gartner LM, Greer FR. Section on Breastfeeding and Committee on Nutrition: Prevention of rickets and vitamin D deficiency: new guidelines for vitamin D intake. *Pediatrics* 2003;111:908-910
30. Bouillon R, Carmeliet G, Daci E, Segaert S, Verstuyf A. Vitamin D Metabolism and Action. *Osteoporosis International* 1998;8:S13-S19
31. Cook NE, Walgate J, Haddad Jr JG. Human serum binding protein for vitamin D and its metabolites. I. Physicochemical and immunological identification in human tissues. *J. Biol. Chem* 1979;254:5958-64
32. Guyton KZ, Kensler TW & Posner GH. Cancer Chemoprevention using natural vitamin D and synthetic analogs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2001;41:421-42
33. Garland CF, Garland FC, Gorham ED. Can colon cancer incidence and death rates be reduced with calcium and vitamin D? *American Journal of Clinical Nutrition* 1991; 54:193S-201S
34. Ellman P, Anderson KH. Calciferol in tubercular peritonitis with disseminated tuberculosis. *BMJ* 1948;1:394.
35. Manolagas SC, Hustmyer FG, Yu XP. Immunomodulating properties of 1,25 dihydroxy vitamin D₃, *Kidney Int.* 1990;38:S9-S16
36. Chan TYK. Differences in vitamin D status and calcium intake: possible explanations for the regional variations in the prevalence of hypercalcemia in tuberculosis. *Calcif Tissue Int* 1997;60:91-93.
37. Cadranel J, Garabedian M, Milleron B, Guillozo H, Akoun G, Hance AJ. 1,25 (OH)₂ D₃ production by T lymphocytes and alveolar macrophages recovered by lavage from normocalcemic patients with tuberculosis. *J Clin Invest* 1990;85:1588-1593.
38. Mathieu C, Waer M, Casteels K, Laureys J, Bouillon R. Prevention of type 1 diabetes in NOD mice by non hypercalcemic doses of a new structural analog of 1,25dihydroxy vitamin D₃, KH 1060. *Endocrinology* 1995;3:866-872.
39. Pozzilli P, Manfrini S, Crino A, Picardi A, Leomanni C, Cherubini V. Vitamin D₃ and type 1 Diabetes. *Horm Metab Res* 2005;37:680-683.
40. Cantorna: Transplantation 1998;66:828-831.
41. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin -6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Atherosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1999;19:2364-2367.

42. Müller K, Diamant M, Bendtzen K. Inhibition of production and function of interleukin-6 by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Immunology Letters* 1991(a);28:115-120.
43. Scragg R, Jackson R, Holdaway IM, Lim T, Beaglehole R. Myocardial infarction is inversely associated with plasma 25-dihydroxyvitamin D3 levels: a community based study. *International Journal of Epidemiology*. 1990;19:559-563.
44. 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.
45. Cantorna MT, Curtis J, Bemiss C, Mahon BD. 1,25-dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J Nutr* 2000;130:2648-2652.
46. Ivanov AP, Dragunsky EM, Chumakov KM. 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances systemic and mucosal immun responses to inactivated poliovirus vaccine in mice. *J Infect Dis* 2006;193:598-600.
47. Abbas A.K., Lichtman A.H. Temel İmmünoloji. 1.Baskı. İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık 2007:14
48. Kılıçturgay K. İmmünoloji. 3.Baskı. İstanbul, Nobel & Güneş. 2003:22.
49. G.Penna, L. Adorini. 1 Alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000;164:2405-2411
50. A.G.van Halteren, E.van Etten, E.C.de Jong, R. Bouillon, B.O.Roep, C.Mathieu Redirection of human autoreactive T-cells upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Diabetes* 2002; 51: 2119-2125.
51. Kılıçturgay K. İmmünoloji. 3.Baskı. İstanbul, Nobel & Güneş. 2003:21.
52. H.Xu, A.Soruri, R.K.Gieseler, JH Peters. 1,25-dihydroxyvitamin D3 exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-2 antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. *Scand. J. Immunol* 1993;38:535-540.
53. Abbas A.K., Lichtman A.H. Temel İmmünoloji. 1.Baskı. İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık. 2007:9-12.
54. M.Cippitelli, A.Santoni. Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon gamma gene. *Eur. J.Immunol* 1998;28:3017-3030.
55. A.Takeuchi, G.S. Reddy, T.Kobayashi, T.Okano, J.Park, S.Sharma. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-mediated effects. *J.Immunol* 1998;160:209-218.
56. A. Tobler, J.Gasson, H.Reichel, A.W.Norman, H.P.Koeffler, Granulocyte – macrophage colony-stimulating factor. Sensitive and receptor –mediated regulation

by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in normal human peripheral blood lymphocytes. *J. Clin. Invest* 1987;79:1700-1705.

57. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol* 1995;155:1151-64.
58. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Cao W, Liu Y J. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 2005;436:1181-5.
59. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD4⁺ specific NKT cells: development, specificity, and function. *Annu Rev. Immunol* 1997;15:535-62
60. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531-62
61. Shevach EM: CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002;2:389-400.
62. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenka S, De Vries JE et al. A CD4⁺T cell subset inhibits antigen specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-42
63. Roncarolo MG, Gregori S, Levings M. Type I T regulatory cells and their relationship with CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Novartis Found Symp* 2003;252: 115-27;discussion 127-131,203-110
64. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001;182:207-14.
65. Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suciuc-Foca N. Specific suppression of T helper/alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8⁺CD28⁺T cells. *Int Immunol* 1998;10:775-83
66. Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 2000;6:782-9
67. Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gamma delta T cells. *Nat Rev Immunol* 2003;3:233-42
68. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Ohtsuka F, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999;162:5317
69. Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287-96.

70. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001;167:1137-40.
71. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000;164:183-90.
72. Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol* 2001;2:1126-32.
73. Fisson S, Darrasse-Jeze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, et al. Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 2003;198:737-46.
74. Walker LS, Chodos A, Eggena M, Doms H, Abbas AK. Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med* 2003;198:249-58.
75. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001;2:816-22.
76. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2:816-22.
77. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942-9.
78. Gallimore A, Sakaguchi S. Regulation of tumour immunity by CD25+T cells. *Immunology* 2002;107:5-9.
79. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 1999;59:3128-33.
80. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999;163:5211-8.
81. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000;12:431-40.
82. Stephens LA, Mason D. CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25-subpopulations. *J Immunol* 2000;165: 3105-10.
83. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000;192:303-10.

84. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-6.
85. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
86. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003;4:337-42.
87. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001;27:68-73.
88. Christian Mottet, Dela Golshayan. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use. *Swiss Med. wKLY* 2007;625-634.
89. Curotto de Lafaille MA, Muriglan S, Sunshine MJ, Lei Y, Kut-chukhidze N, Furtado GC, et al. Hyperimmunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J Exp Med* 2001;194:1349-59.
90. Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 2003;197:111-9.
91. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 2004;4:841-55.
92. Golshayan D, Jiang S, Tsang J, Garin MI, Mottet C, Lechler RI. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood* 2007;109:827-35.
93. Rieger K, Loddenkemper C, Maul J, Fietz T, Wolff D, Terpe H, et al. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 2006;107:1717-23.
94. Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, et al. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;106:2903-11.
95. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 2003; 9:4404-8.
96. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002; 169: 2756- 61.
97. Vguier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochoy G, Du-bertret L, et al. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human

metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 2004;173:1444-53.

98. Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, et al. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *Immunol* 2002;168:4272-6.
99. Jiang S, Camara N, Lombardi G, Lechler RI. Induction of allopeptide-specific human CD4+CD25+ regulatory T cells ex vivo. *Blood* 2003;102:2180-6.
100. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, et al. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004; 199: 455-65.
101. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004;199:1467-77.
102. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 2005;105:4743-8.
103. J. Banchereau, R.M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252.
104. H.Jonuleit, E.Schmitt, G.Schuler, J.Knop, A.H.Enk. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+)T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med* 2000;192:1213-1222
105. M.D. Griffin, W. Lutz, V.A.Phan, L. A. Bachman, D.J. McKean, R.Kumar. Dendritic cell modulation by 1 α , 25dihydroxyvitamin 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. U.S.A* 2001;98:6800-5
106. Evelyné van Etten, Chantal Mathieu. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: Basic concepts. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2005;97: 93-101
107. C. Mathieu, M. Waer, K. Casteels, J. Laureys, R. Bouillon, Prevention of type I diabetes in NOD mice by nonhypercalcemic doses of a new structural analog of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, KH1060, *Endocrinology*.1995;136:866–872.
108. C. Mathieu, M. Waer, J. Laureys, O. Rutgeerts, R. Bouillon, Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D₃, *Diabetologia* 1994;37:552–558.
109. K.M. Casteels, C. Mathieu, M. Waer, D. Valckx, L. Overbergh, J.M. Laureys, R.Bouillon. Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by late intervention with nonhypercalcemic analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in combination with a short induction course of cyclosporin A, *Endocrinology* 1998;139:95–102.

110. J.M. Lemire, D.C. Archer, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Clin. Invest* 1991;87: 1103–1107.
111. J.M. Lemire, A. Ince, M. Takashima, 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice, *Autoimmunity* 1992;12: 143–148.
112. P. Larsson, L. Mattsson, L. Klareskog, C. Johnsson, A Vitamin D analogue (MC 1288) has immunomodulatory properties and suppresses collagen-induced arthritis (CIA) without causing hypercalcaemia, *Clin. Exp. Immunol* 1998;114:277–283.
113. C.A. Redaelli, M. Wagner, D. Gunter-Duwe, Y.H. Tian, P.F. Stahel, L. Mazzucchelli, R.A. Schmid, M.K. Schilling, 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ shows strong and additive immunomodulatory effects with cyclosporine A in rat renal allotransplants, *Kidney Int.* 2002;61:288–296.
114. D.A. Hullett, M.T. Cantorna, C. Redaelli, J. Humpal-Winter, C.E. Hayes, H.W. Sollinger, H.F. DeLuca, Prolongation of allograft survival by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, *Transplantation* 1998;66:824–828.
115. C. Johnsson, G. Tufveson, MC 1288—a Vitamin D analogue with immunosuppressive effects on heart and small bowel grafts, *Transpl. Int* 1994;7:392–397.
116. C.A. Redaelli, M. Wagner, Y.H. Tien, L. Mazzucchelli, P.F. Stahel, M.K. Schilling, J.F. Dufour, 1-alpha,25-Dihydroxycholecalciferol reduces rejection and improves survival in rat liver allografts, *Hepatology* 2001;34:926–934.
117. D.L. Bertolini, P.R. Araujo, R.N. Silva, A.J. Duarte, C.B. Tzanno-Martins, Immunomodulatory effects of Vitamin D analog KH1060 on an experimental skin transplantation model, *Transplant. Proc* 1999;31:2998–2999.
118. S. Gregori, M. Casorati, S. Amuchastegui, S. Smiroldo, A.M. Davalli, L. Adorini, Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance, *J. Immunol* 2001;167:1945–1953.
119. A.K. Raisanen-Sokolowski, I.S. Pakkala, S.P. Samila, L. Binderup, P.J. Hayry, S.T. Pakkala, A Vitamin D analog, MC1288, inhibits adventitial inflammation and suppresses intimal lesions in rat aortic allografts, *Transplantation* 1997;63:936–941.
120. Gannage –Yared MH, Chemali R, Yaacoub N, Halaby. Hypovitaminosis D in a sunny country: relation to lifestyle and bone markers. *J Bone Miner Res* 2000;15:1856–1862
121. Lapatsanis D, Moulas A, Cholevas V, Soukakos P, Papadopoulou ZL, Challa A. Vitamin D: a necessity for children and adolescents in Greece. *Calif Tissue Int* 2005;77:348–355.
122. DeLucia M, Carpenter T. Rickets in the sunshine? *Nutrition* 2000;8:97–98.

123. Sachan A, Gupta R, Das V, Agarwal A, Awasthi PK, Bhatia V. High prevalence of vitamin D deficiency among pregnant women and their newborns in northern India. *Am J Clin Nutr* 2005;81:1060-1064.
124. Nicolaidou P, Hatzistamatiou Z, Papadopoulou A, Kaleyias J. Low vitamin D status in mother –newborn pairs in Greece. *Calcif Tissue Int.* 2006;78:337-342.
125. Hollis W Bruce. Vitamin D requirement during pregnancy and lactation. *Journal of bone and mineral research.*2007;22:V39-44
126. Van der Meer IM, Karamali NS, Boeke AJ, Lips P, Middelkoop BJ, Verhoeven I, Wuister JD. High prevalence of vitamin D deficiency in pregnant non-Western women in The Hague, Netherlands. *Am J Clin Nutr* 2006 Aug;84:829:84273.
127. Güzel R, Kozanoğlu E, Guler –Uysal F, Soyupak S, Sarpel T. Vitamin D status and bone mineral density of veiled and unveiled Turkish women. *J Womens Health Gend Based Med* 2001 Oct; 10(8):765-70.
128. Atiq M, Suria A, Nizami SQ, Ahmed I. Vitamin D status of breastfed Pakistani infants. *Acta Paediatr* 1998;87:737-40.
129. S H Dijkstra, A van Beek, J W Janssen, L H M de Vleeschouwer, WA Huysman, E LT van der Akker. High prevalence of vitamin D deficiency in newborn infants of high risk mothers. *Arch Dis Child* 2007;92:750-753.
130. Fujisawa Y, Kida K, Matsuda H. Role of change in vitamin D metabolism with age in calcium and phosphorus metabolism in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1984 Oct;59(4):719-26.
131. Dibyendu K.Panda, Dengshun Miao, Michel L.Tremblay, Jacinthe Sirois, Riaz Farookhi, Geoffrey N. Hendy. Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase enzyme: Evidence for skeletal, reproductive and immune function. *PNAS* 2001 June;98(13):7498-7503.
132. Chantal Mathieu, Evelyn Van Etten, Conny Gysemans, Brigitte Decallonne, Shigea Kato, Jos Laureys, Jos Depovere, Dirk Valckx, Annemieke Verstuyf, Roger Bouillon. *Journal of Bone and Mineral Research* 2001;16(11):2057-2065.
133. Çakmak FN, Erol M, Ergül P, Yalçın A. T lymphocytes and vitamins. *Journal of Pediatrics.*1999;135:531.
134. Conny Gysemans, Evelyne van Etten, Lutgart Overbergh, Annapaula Giuliatti, Guy Eelen, Mark Waer, Annemieke Verstuyf, Roger Bouillon, Chantal Mathieu. Unaltered Diabetes Presentation in NOD Mice Lacking the Vitamin D receptor. *Diabetes* 2008;57: 269- 275.
135. Tang J, Li BQ, Ruan J, Zhang LJ. Expression of Foxp3 in CD4CD25(high) Treg cells of neonatal cord blood 2008 April;24:365-367.
136. B.J.Rudy, C.M.Wilson, S.Durako, A.B.Moscicki, L. Muenz, S. D. Douglas. Peripheral blood lymphocyte subsets in adolescents: a longitudinal analysis from the REACH Project. *Clin. Diag. Lab. Immunol* 2002;9:959-965

137. W.M.Comans –Bitter, R.de Groot, R.van den Beemd, H.J.Neijens, W.C.Hop, K.Groeneveld, H.Hooijkaas, J.J.van Dongen. Immunolphenophyting of blood lymphocytes in childhood. *J.Pediatr* 1997;130:388-393.
138. B.J.Rudy, C.M.Wilson, S.Durako, A.B.Moscicki, L. Muenz, S. D. Douglas. Perferal blood ymphocyte subsets in adolescents: a longitudinal analysis from the REACH Project. *Clin. Diag. Lab. Immunol* 2002;9:959-965
139. W.M.Comans– Bitter, R.de Groot, R.van den Beemd, H.J.Neijens, W.C.Hop, K.Groeneveld, H.Hooijkaas, J.J.van Dongen. Immunolphenophyting of blood lymphocytes in childhood. *J.Pediatr* 1997;130:388-393.
140. Tollerrud D.J., S.T.Ildsstad, L.M.Brown, J.W.Clark, W.A.Blattner, D.L.Mann, C.Y.Neuland, L.Pankiw-Trost, and R.N.Hoover. T cell subsets in heathy teenagers: transition to the adult phenotype. *Clin. Immunol. Immunopathol* 1990;56:88-96.
141. Lahita, R.G. Gender and the immun system. *J. Gende Specific Med* 2000;3:19-22.
142. McMurray, R.W., R.W.Hoffman, W.Nelson, and S.E.Walker. Cytokine Mrna expression in the B/W Mouse model of systemic lupus erythematosus –analyses of strain, gender, and age effects. *Clin. Immunol. Immunopathol* 1997;84:260-268.
143. Polanczyk M.J., B.D.Carson, S.Subramanian, M.Afentoulis, A. A. Vanderbank, S.F.Ziegler, H.Offner. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+regulatory T cell compartment. *J Immunol* 2004;173:2227-2230.
144. Jay Reddy, Hanspeter Waldner, Xingmin Zhang, Zsolt Illes, Kai W. Wucherpfennig, Raymond A.Sobel, Vijay K. Kuchroo. Cutting Edge: CD4+CD25+Regulatory Cells Contribute to Gender Differences in Susceptibility to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunology* 2005;175:5591-5595
145. Grossman, C. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. *J. Steroid Biochem* 1989;34:241-251
146. Lahita, R.G. Sex and age in systemic lupus erythematosus. Wiley Medical, New York, N.Y. 1987:523-529
147. Bee-Wah Lee, Hui –Kim Yap, Fook –Tim Chew, Thuan –Chong Quah, Krishnan Prabhakaran, Georgett S.H. Chan, Siew –Chen Wong, and Ching-Ching Seah. Age – and sex related changes in lymphocyte subpopulations of healthy subjects: From birth to adulthood. *Cytometry*1996;26:8-15
148. Abdelhamim S.Najada, Moen S.Habashneh, and Maher Khader. The frequency of nutritional rickets among hospitalized infants and its relation to respiratory diseases. *Journal of tropical pediatrics* 2004;50:364-368
149. Zhang C, Qiu C, Hu FB, David RM, van Dam RM, Bralley A, Williams MA. Maternal plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and the risk for gestational diabetes mellitus *Plos one* 2008;3:e3753

150. Bodnar LM, Catov JM, Simhan HM, Holick MF, Powers RW, Roberts JM. Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. *J Clin Endocrinol* 2007;92:3517-22
151. Hyppönen E, Hartikainen AL, Sovio U, Jarvelin MR, Pouta A. Does vitamin D supplementation in infancy reduce the risk of pre-eclampsia? *Eur J Clin Nutr* 2007;61:1136-9.
152. Hyppönen E. Vitamin D for the prevention of preeclampsia? A Hypothesis. *Nutr Rev* 2005;63:225-32
153. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001;182:18-32
154. Wan Fai Ng, Phillip J.Duggan, Freerique Ponchel, Giuseppe Matarese, Giovanna Lombardi, A. David Edwards, John D. Isaacs and Robert I. Lechler. Human CD4+CD25+ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001;98:2736-2744