

Relationship between vitamin D plasma level and Foxp3 gene expression among rheumatoid arthritis patients

Zafari P.^{1,2}, Mostafaei Sh.³, Iranshahi N.^{1,2}, Jalili C.⁴, Taghadosi M., PhD⁵

1. Student Research Committee, Medical school, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
2. Immunology Department, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
3. Rheumatology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
5. Assistant Professor in Department of Immunology, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran, (Corresponding Author), Tel:+98-83-34274623, mtaghad@gmail.com

ABSTRACT

Background and Aim: Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease. It seems that the function of regulatory T cells (Tregs) is compromised in RA. Foxp3 is a critical transcription factor of these cells. The aim of this study was to determine the relationship of vitamin D plasma level with Foxp3 gene expression in the patients with RA.

Material and Methods: 18 untreated RA patients and 41 healthy people participated in this study. Plasma levels of vitamin D were measured by competitive ELISA method. Foxp3 gene expression was also determined by using realtime PCR technique.

Results: The expression of Foxp3 gene was significantly lower in RA patients compared to that in the healthy controls ($p<0.001$). There was no significant relationship between vitamin D plasma levels with the rate of Foxp3 gene expression.

Conclusion: We found low levels of vitamin D could not affect the expression of Foxp3 gene. It seems that vitamin D deficiency cannot be considered as an effective environmental factor in the pathogenesis of RA.

Keywords: Vitamin D, Foxp3, Rheumatoid arthritis.

Received: Jul 2, 2017 **Accepted:** Sep 24, 2017

بررسی رابطه‌ی سطح پلاسمایی ویتامین D با میزان بیان ژن Foxp3 در بیماران مبتلا به آرتیت روماتوئید

پریسا خفری^۱، شایان مصطفایی^۲، نسرین ایرانشاهی^۳، سیروس جلیلی^۴، مهدی قدسی^۵

۱. کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۲. گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۳. مرکز تحقیقات روماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۴. مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۵. استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران، (مؤلف مسؤول)، تلفن ثابت: ۰۸۳-۳۴۲۷۴۶۲۳،

mtaghad@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: آرتیت روماتوئید یک بیماری خودایمن است. به نظر می‌رسد که در این بیماری عملکرد سلول‌های T تنظیمی مختلف باشد. Foxp3، فاکتور نسخه برداری ضروری برای تکامل این سلول‌هاست. این مطالعه با هدف بررسی رابطه‌ی سطح پلاسمایی ویتامین D با میزان بیان ژن Foxp3 در مبتلایان به آرتیت روماتوئید انجام شده است.

روش بررسی: ۱۸ بیمار درمان نشده‌ی آرتیت روماتوئید و ۴۱ فرد سالم در این مطالعه شرکت کردند. سطح پلاسمایی ویتامین D به روش الایزای رقابتی سنجیده شد. بیان ژنی فاکتور نسخه برداری Foxp3 نیز با استفاده از تکنیک Realtime PCR انجام گرفت.

یافته‌ها: بیان ژن Foxp3 در مبتلایان به آرتیت روماتوئید با اختلاف معناداری پایین‌تر از گروه کنترل بود ($P < 0.001$). بین سطح پلاسمایی ویتامین D با میزان بیان ژن Foxp3 رابطه‌ی معناداری یافت نشد.

نتیجه گیری: کم بودن سطح پلاسمایی ویتامین D قادر به اعمال اثر بر بیان ژن Foxp3 نمی‌باشد. به نظر می‌رسد که نتوان کمبود ویتامین D را به عنوان یک عامل محیطی تاثیرگذار در بیماری زایی آرتیت روماتوئید معرفی کرد.

کلید واژه: ویتامین D، آرتیت روماتوئید

وصول مقاله: ۹۶/۶/۱۵ اصلاحیه نهایی: ۹۶/۶/۲۰ پذیرش: ۹۶/۷/۲

سرکوب تولید IL-12 توسط سلول های دندرتیک (DC) منجر به مهار تمایز TH1 و با افزایش تولید IL-10 و 1L-IL-10 با افزایش تولید TH1 می شود (۹). در سلول های درم و اپی درم انسانی، Treg و Treg 1,25(OH)2D3 باعث تعديل تعداد سلول های Treg ها می شود (۱۰). متابولیسم موضعی ویتامین D به سلول های ایمنی اجازه می دهد که پاسخ های ایمنی را تعديل کنند اما بهینه سازی این مسیر به شدت به سطح ۲۵ هیدروکسی ویتامین D (۱۱). یک ناحیه تحت عنوان VDRE^۳ در پرموتور ژن Foxp3 وجود داشته که نقش مهمی در بیان آن دارد. اتصال او ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D به گیرنده اش (VDR)^۴ باعث فعال شدن آن می شود، سپس این کمپلکس با اتصال به Foxp3 در ژن Foxp3 که فاکتور نسخه برداری ضروری برای سلول های T تنظیمی می باشد، از طریق تقویت فعالیت پرموتور، بیان آن را افزایش می دهد (۱۲). می توان گفت که اثر تعديل کنندگی این ویتامین بر سیستم ایمنی ناشی از اثر آن بر ژن Foxp3 است. بر این اساس یک مطالعه در این زمینه در بیماران SLE صورت گرفته که نشان دهنده ای آن است که بیماران پس از مصرف مکمل های ویتامین D به صورت معناداری با افزایش بیان فاکتور Foxp3 موافق می شوند (۱۳). به نظر می رسد که این اثر در سایر بیماری های خودایمن دیگر نیز وجود داشته باشد. در این بررسی جهت کاهش اثر احتمالی داروها بر سطح ویتامین D از نمونه های بیماران آرتربیت روماتوئید درمان نشده (new case) استفاده شده است. در صورتی که بتوان کمبود ویتامین D را به عنوان یک فاکتور محیطی در پاتوزن RA معرفی کرد، می توان با تامین هر چه بیشتر این ویتامین در رژیم غذایی مبتلایان RA، اثرات تنظیم کنندگی آن بر

مقدمه

بیماری آرتربیت روماتوئید (RA) یک بیماری خودایمن مزمن، با علت ناشناخته و شیوع ۱٪ در جهان است. این بیماری با درد، خشکی مفاصل و التهاب غشای سینوویال همراه می باشد. مجموعه ای از سلول های ایمنی مانند سلول های T، B و ماکروفازها در ایجاد این التهاب دخیل هستند (۱). اصلی ترین عامل ایجاد بیماری های خودایمن مانند آرتربیت روماتوئید را می توان اختلال در حفظ مکانیسم های تحمل خودی^۱ دانست (۲). مکانیسم های مختلفی برای ایجاد این تحمل در سیستم ایمنی بدن تعییه شده است، سلول T های Treg^۲ زیرمجموعه ای از سلول های سلول های CD25⁺ CD4⁺ تنظیمی^۳ یک فاکتور نسخه برداری به نام Foxp3 را بیان کرده که برای حفظ عملکرد آن ها و سرکوب پاسخ های ایمنی نابجا ضروری است (۳). مطالعات مختلفی نشان دهنده ای کاهش تعداد سلول های Treg در بیماری های خودایمن مانند آرتربیت روماتوئید است (۴). علاوه بر مکانیسم های ایمنی فاکتورهای محیطی و ژنتیکی نیز در ایجاد آرتربیت روماتوئید و میزان فعالیت آن دخالت دارند. شناسایی گیرنده ای ویتامین D در سلول های سیستم ایمنی و توانایی سلول های دندرتیک در تولید فرم فعال ویتامین D تحت عنوان ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D3 [1,25(OH)2D3]^۴ منجر به ایجاد این فرضیه شد که ویتامین D یک تعديل کننده ای پاسخ های سیستم ایمنی^۲ است (۶). اهمیت این ویتامین به عنوان یک فاکتور محیطی در چندین بیماری خودایمن شامل مالتیپل اسکلروزیس (MS) و سیستمیک لوبوس اریتماتوز (SLE) نشان داده شده است (۷). یکی از اثرات این ویتامین تحریک سیستم ایمنی ذاتی و مهار سیستم ایمنی تطبیقی گزارش شده است (۸). 1,25(OH)2D3 با

^۳. vitamin D response element

^۴. vitamin D receptor

^۱. self-tolerance

^۲. immune modulator

ELISA reader STAT FAX 4200 تعیین شد، در این کیت ویتامین D بیوتینه موجود در کیت با ویتامین D پلاسما برای اتصال به آنتی ویتامین D موجود در کف چاهک ها رقابت می کند.

استخراج RNA و سنتر cDNA:

استخراج RNA از سلول های خون محیطی بلا فاصله پس از نمونه گیری با استفاده از پروتکل کیت RNX PLUS ساخت ایران انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به ترتیب توسط ژل الکتروفورز و دستگاه نانودرایپ (NanoDrop Thermo Scientific) ارزیابی شد. سنتر cDNA با استفاده از کیت تجاری تولید شرکت Transcriptor First Strand cDNA (Roche Synthesis Kit) و مطابق دستورالعمل کیت انجام شد.

بررسی بیان ژنی Foxp3:

با استفاده از تکنیک Real-time PCR بیان نسبی Foxp3 در دو گروه بیمار و کنترل سنجیده شد. در این مطالعه از β -actin به عنوان ژن housekeeping استفاده گردید. پرایمر های دو ژن Foxp3 و β -actin با استفاده از سایت آنلاین Oligocalc و طراحی و برای بررسی ویژگی نیز با استفاده از سایت آنلاین NCBI Real-time PCR واکنش با لاست شد. واکنش SYBR Green Master Mix: (TAKARA RNase H Plus SYBR Premix Ex Taq II و Roche Life Science LightCycler® 96 دستگاه انجام شد. واکنش PCR در حجم $20 \mu\text{L}$ مطابق پروتکل کیت و برای کنترل کار به صورت دوتایی بر روی هر نمونه صورت گرفت. برنامه ای زمانی دستگاه جهت تکثیر شامل سه مرحله به صورت ۱ سیکل preincubation با دمای ۹۵ به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ سیکل amplification به صورت ۹۵ درجه به مدت ۵ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۱ سیکل melting با دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۶۰ ثانیه

سیستم ایمنی و سلول های T تنظیمی را بالا برد. لازم به ذکر است که در جستجوهای انجام شده مقاله ای مشابه یافت نشده است. از این رو این مطالعه با هدف بررسی رابطه میزان سطح پلاسمایی ویتامین D با بیان ژن Foxp3 در بیماران آرتیت روماتوئید صورت گرفت.

روش بررسی

جمع آوری نمونه ها:

این مطالعه از نوع تحلیلی- مقطعی است و نمونه گیری به صورت تصادفی از بین بیماران RA در دسترس که سابقه ای مصرف داروی مرتبط با بیماری RA را نداشته اند، صورت گرفته است. نمونه های خون محیطی از بیماران مراجعه کننده به کلینیک هلال احمر علوم پزشکی کرمانشاه در بازه ی زمانی ۶ ماهه ای تابستان و پاییز ۹۴ جمع آوری شد. پس از شناسایی بیماران آرتیت روماتوئید توسط پزشک متخصص روماتولوژی مطابق معیارهای EULAR^۵ و آزمایش های تاییدی اقدام به نمونه گیری از ۱۸ بیمار آرتیت روماتوئید شد (۱۵ زن، ۳ مرد، میانگین سنی ۴۳ سال). ۴۱ نمونه ای کنترل (۳۴ زن، ۷ مرد، میانگین سنی ۴۴ سال) نیز پس از همسان سازی از لحاظ سن و جنس با گروه بیماران از کارکنان دانشکده ای پزشکی این دانشگاه در همان بازه ای زمانی جمع آوری شد. افراد مصرف کننده ای مکمل ویتامین D یا افراد دارای سابقه ای بیماری های روماتیسمی و خودایمن از مطالعه خارج شدند ابتدا توضیحات لازم در مورد طرح به افراد داده شد و هر شرکت کننده با اعلام رضایت شخصی و پر کردن فرم رضایت نامه در این مطالعه شرکت کرده است.

سنجهش سطح پلاسمایی ویتامین D:

میزان ویتامین D پلاسما به روش مشاهده و اندازه گیری با Ratio Diagnosis ELISA و کیت (RD) به روش روابطی مطابق پروتکل و با استفاده از دستگاه

⁵. American College of Rheumatology

⁶. European League Against Rheumatism

$\Delta Ct \times 1000$) محاسبه گردید. سپس با استفاده از روش Quantile Normalization) (تفاوت ΔCt به این صورت که پس از محاسبه ΔCt ژن مرجه از ژن هدف) برای هر فرد، از فرمول $2^{-\Delta Ct}$ برای بدست آوردن میزان بیان mRNA ژن Foxp3 استفاده شد، در نهایت میانگین بیان ژن برای دو گروه کنترل و بیمار بدست آمد (نمودار۱)، از مقایسه‌ی میانگین بیان ژن دو گروه مشخص شد که بیان ژن Foxp3 در دو گروه با هم اختلاف معناداری دارد ($P < 0.001$). از تقسیم میانگین بیان ژن گروه بیمار بر میانگین بیان ژن گروه کنترل، تغییرات فولدی ارزیابی شد. بر این اساس مشخص شد که میزان بیان ژن Foxp3 در گروه بیمار ، 0.36 میزان بیان این ژن در گروه کنترل است، به عبارتی میزان آن کمتر می‌باشد (جدول ۴).

و ۹۵ درجه به مدت ۱ ثانیه داده شد. همچنین جهت اطمینان از بازده واکنش، منحنی استاندارد با efficiency Foxp3 و β -actin برابر $1/96$ و $1/90$ به ترتیب برای ژن β -actin بدست آمد،^۲ این دو ژن به ترتیب معادل 0.99 و 0.94 محاسبه شد.

تحلیل آماری:

تحت فرض کمی بودن و نرمالیتی از ازمون پارامتریک تی مستقل و درصورت تخطی از این مفروضات از ازمون غیرپارامتری من ویتنی استفاده شده است و تحلیل همبستگی نیز با استفاده از همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن انجام شد. کلیه تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزارهای SPSS نسخه ۱۶ و GraphPad Prism نسخه ۶ صورت پذیرفت. سطح معنی داری آماری 0.05 در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

به طور کلی میانگین سطح پلاسمایی ویتامین D و بیان ژن Foxp3 در دو گروه بیمار و کنترل تفاوت معناداری نشان داد.

ویتامین D:

با آنالیز آماری داده‌های بدست آمده دستگاه الایزا مشخص شد که سطح پلاسمایی ویتامین D در دو گروه با هم اختلاف معناداری داشته ($P = 0.034$) و میانگین سطح آن در گروه بیمار بیشتر از گروه کنترل است (جدول ۱). مقایسه‌ی میانگین سطح پلاسمایی این ویتامین حاکی از کمبود نسبی این ویتامین (هر دو در محدوده‌ی cut off) در دو گروه بیمار و کنترل می‌باشد (جدول ۲)، مطابق با مطالعات بسیاری که نشان دهنده‌ی کمبود این ویتامین در ایران است.

بیان ژنی Foxp3:

با استفاده از پرایمرهای طراحی شده (جدول ۳) مقدار بیان ژن Foxp3 به صورت تفاوت در مقدار سیکل آستانه^۷ (CT) نسبت به ژن β -actin بر اساس فرمول لیواک^۲

⁷. Threshold Cycle

جدول ۱: مقایسه ای سطح پلاسمایی ویتامین D در دو گروه بیمار و کنترل

مقدار معنی داری (P)	گروه کنترل	گروه بیمار	سطح پلاسمایی ویتامین D
.۰/۰۳۴	۲۷.۲۲±۳.۵۵۱	۳۸.۴۳±۶.۸۲۶	

* واحد اندازه گیری: ng/ml

جدول ۲: محدوده ای مرتع ویتامین D در کیت RD

محدوده ای مرتع	سطح
۱۰ نانو گرم / میکرولیتر	کمبود
۱۰-۳۰ نانو گرم / میکرولیتر	ناکافی
۳۰-۱۰۰ نانو گرم / میکرولیتر	کافی
۱۰۰ نانو گرم / میکرولیتر	سمی

جدول ۳: توالی پرایمرهای بررسی بیان ژن

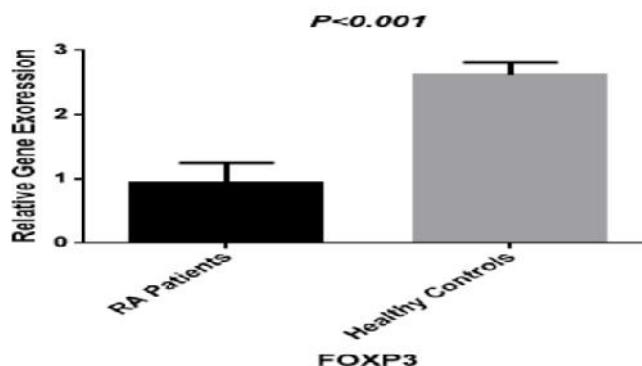
gene	Forward Primer	Reverse Primer	size
β - actin	AATGAGCTGCGTGTGGCTCCC	CAGGGATAGCACAGCCTGGATAGCA	153
Foxp3	AGCACATTCCCAGAGTTCCCTC	CGTGTGAACCAGTGGTAGATC	152

جدول ۴: مقایسه ای بیان ژن Foxp3 در گروه بیمار و کنترل

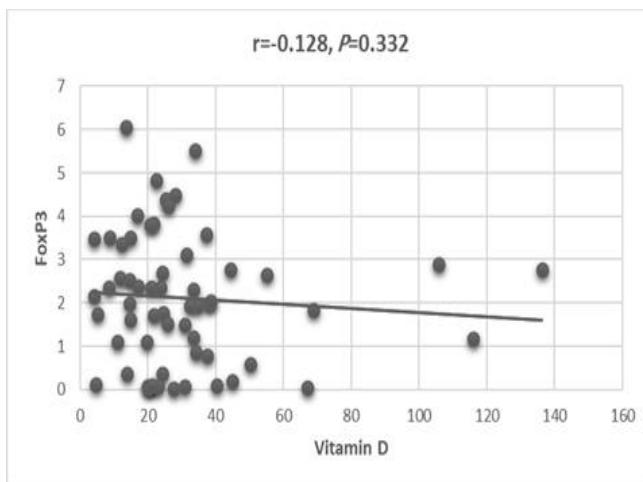
بیان ژن	گروه بیمار	کنترل	کنترل	تغییرات فولد	مقدار معنی داری (P)
Foxp3	.۰۹۳±۰.۳۲۱	.۲۶۱±۰.۱۹۷	.۰۳۶	<۰.۰۰۱	

رابطه ای سطح پلاسمایی ویتامین D با میزان بیان ژنی Foxp3 :

با استفاده از تحلیل همبستگی اسپیرمن مشخص شد که بین سطح پلاسمایی ویتامین D با میزان بیان ژنی Foxp3 رابطه ای معناداری وجود ندارد ($P=۰/۳۳$, $t=۰/۱۲۸$). (نمودار ۲).



نمودار ۱: مقایسه میانگین بیان ژن Foxp3 در گروه بیماران RA و گروه کنترل



نمودار ۲: رابطه بین سطح پلاسمایی ویتامین D با بیان ژن Foxp3

بنابراین طبیعی است که میانگین سطح پلاسمایی ویتامین D این افراد در مقایسه با گروه کنترل مقدار کمتری را نشان دهد در صورتی که تمام بیماران مورد مطالعه در طرح حاضر سابقه‌ی مصرف هیچ دارویی مرتبط با بیماری خود را نداشته‌اند. اما مطابق با یافته‌ی این طرح، افزایش این ویتامین در گروه بیماران آرتربیت روماتوئید نسبت به گروه کنترل نیز گزارش شده است (۱۸ و ۱۹). علاوه بر این، از آنجا که اشعه‌ی UV خورشید بر سنتز ویتامین D تا حدی موثر می‌باشد بهتر است سعی شود که نمونه‌گیری گروه کنترل و بیمار در محدوده‌ی زمانی یکسانی انجام شود. از طرفی بیمارانی که در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته‌اند از لحاظ طول مدت بیماری متفاوت هستند که این موارد خود می‌توانند موجب تناقض در یافته

بحث

در مطالعه‌ی حاضر سطح پلاسمایی ویتامین D در گروه بیماران آرتربیت روماتوئید نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری بالاتر بود. مطالعات مشابه در این زمینه به نتایج مختلفی دست یافته‌اند، برخی از مطالعات حاکی از کاهش این ویتامین در گروه بیماران نسبت به گروه کنترل است (۱۴-۱۶) که دلیل این تفاوت با یافته‌ی طرح ما را می‌توان ناشی از هتروژن بودن بیماران RA و همچنین عدم استفاده از بیماران new case در این بررسی‌ها دانست، زیرا مطالعات نشان می‌دهند مصرف برخی از داروهای تجویز شده به بیماران آرتربیت روماتوئید مانند هیدروکسی کلروکین که از داروهای اصلی در درمان این بیماری است باعث کاهش سطح پلاسمای ویتامین D می‌شود (۱۷).

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نقش سلول های T تنظیمی را به عنوان سلول اصلی در کنترل و مهار التهاب در بیماری های خودایمن تایید می کند و به نظر می رسد که برخلاف تاثیر غیرقابل انکار ویتامین D در دیگر بیماری های خودایمن مانند مالتیپل اسکلروزیس^۸ (MS) نتوان آنرا به عنوان یک فاکتور محیطی موثر در پاتوژنز بیماری آرتربیت روماتوئید در نظر گرفت. پیشنهاد می شود که با افزایش تعداد نمونه ها و استفاده از مدل های حیوانی دارای کمبود ویتامین D، بتوان اثر این ویتامین بر سلول های Treg را دقیق تر ارزیابی کرد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می دانند از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به دلیل حمایت های مالی این طرح تشکر نمایند (شماره ای طرح : ۹۴۴۰۶). مقاله ای حاضر بخشی از کار پایان نامه دانشجویی دوره ای کارشناسی ارشد متعلق به پریسا ظفری می باشد که در دانشکده ای پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شده است.

های مطالعات مختلف باشد. در این مطالعه مطابق با فرضیات از پیش تعیین شده ما ، سطح بیان ژنی Foxp3 در گروه کنترل بالاتر از گروه بیماران بود که با توجه به حیاتی بودن این فاکتور در تکامل سلول های Treg انتظار می رود تعداد این سلول ها نیز متعاقبا در گروه کنترل بالاتر باشد، که با برخی از نتایج بدست آمده در مطالعات قبلی هم خوانی داشت(۲۰ و ۵) این در حالی است که به طور متضاد نتایج چندین مطالعه حاکی از عدم کاهش سلول های Treg در بیماران مبتلا به آرتربیت روماتوئید است (۲۱-۲۳)، دلیل این مغایرت را می توان به دلیل عدم انتخاب شاخص یکسان برای سنجش سلول های T تنظیمی و همچنین ناهمگون بودن بودن بیماران از لحاظ شدت بیماری نسبت داد. در مطالعاتی که نتایج متفاوتی نسبت به مطالعه حاضر داشتند از بیان ژنی Foxp3 جهت ارزیابی سلول های Treg استفاده نشده است بلکه بیان شاخص های سطح سلولی CD4 CD25 برای شناسایی آن ها مد نظر قرار گرفته است. برخلاف فرضیه ای اویله ای این طرح، بین سطح پلاسمایی ویتامین D با میزان بیان ژن Foxp3 رابطه ای معناداری دیده نشد. چندین عامل در مشاهده ای این یافته می توانند موثر باشند، ابتدا اینکه بهتر است در کنار سنجش سطح پلاسمایی D ویتامین D، بررسی ژنوتاپ های پذیرنده ویتامین VDR (VDR) نیز انجام گیرد، زیرا ممکن است مشاهده ای عدم ارتباط معنی دار بین سطح پلاسمایی ویتامین D و افزایش بیان ژن Foxp3 ناشی از عملکرد ناقص رسپتور آن باشد تا غلظت پلاسمایی ویتامین D . علاوه بر این گرچه در این مطالعه از لحاظ آماری سطح ویتامین D گروه بیمار بالاتر از گروه کنترل بود اما غلظت پلاسمایی این ویتامین در هر دو گروه در محدوده ای cut off کیت برای کمبود ویتامین D قرار داشت که می توان اینگونه بیان کرد که شاید برای اعمال اثر این ویتامین بر بیان ژن Foxp3 نیاز به سطح بالاتری از این ویتامین در افراد باشد، چالشی که در بسیاری از افراد ایرانی وجود دارد.

⁸. Multiple sclerosis

Reference

1. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2008;118:3537-45.
2. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6:345-52.
3. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, et al. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 2009;326:986-91.
4. Lawson C, Brown A, Bejarano V, Douglas S, Burgoyne C, Greenstein A, et al. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+ CD25high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1210-7.
5. Jiao Z, Wang W, Jia R, Li J, You H, Chen L, et al. Accumulation of FoxP3-expressing CD4+ CD25+ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2007;36:428-33.
6. Carvalho C, Marinho A, Leal B, Bettencourt A, Boleixa D, Almeida I, et al. Association between vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus in Portuguese patients. *Lupus* 2015;4:846-53.
7. Cutolo M. Vitamin D and autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatology* 2009;48:210-12.
8. Hart PH, Gorman S. Exposure to UV wavelengths in sunlight suppresses immunity. To what extent is UV-induced vitamin D3 the mediator responsible. *Clin Biochem Rev* 2013;34:3-13.
9. Bansal AS, Henriquez F, Sumar N, Patel S. T helper cell subsets in arthritis and the benefits of immunomodulation by 1, 25 (OH) 2 vitamin D. *Rheumatol Intern* 2012;32:845-52.
10. Kamen D, Aranow C. Vitamin D in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20:532-7.
11. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Rheumatol* 2010;10:482-96.
12. Kang SW, Kim SH, Lee N, Lee W-W, Hwang K-A, Shin MS, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 promotes FOXP3 expression via binding to vitamin D response elements in its conserved noncoding sequence region. *J Immunol* 2012;188:5276-82.
13. Marinho A, Carvalho C, Boleixa D, Bettencourt A, Leal B, Guimarães J, et al. Vitamin D supplementation effects on FoxP3 expression in T cells and FoxP3+/IL-17A ratio and clinical course in systemic lupus erythematosus patients: a study in a Portuguese cohort. *Immunol Res* 2017;65:197-206.
14. Elbassiony SR, Tawhid Z, Ahmad HS, Sabry A. Serum 25-hydroxy vitamin D levels in Egyptian patients with rheumatoid arthritis: Association with disease activity, functional disability and radiological damage. *Egypt Rheumatol* 2016;38:133-9.
15. Sharma R, Saigal R, Goyal L, Mital P, Yadav R, Meena P, et al. Estimation of vitamin D levels in rheumatoid arthritis patients and its correlation with the disease activity. *J Assoc Physicians India* 2014;62:678-81.
16. Gheita TA, Sayed S, Gheita HA, Kenawy SA. Vitamin D status in rheumatoid arthritis patients: relation to clinical manifestations, disease activity, quality of life and fibromyalgia syndrome. *Intern J Rheum Dis Int* 2016;19:294-9.
17. Huisman AM, White KP, Algra A, Harth M, Vieth R, Jacobs J, et al. Vitamin D levels in women with systemic lupus erythematosus and fibromyalgia. *J Rheumatol* 2001;28:2535-9.
18. Sahebari M, Mirfeizi Z, Rezaieyazdi Z, Rafatpanah H, Goshayeshi L. 25 (OH) vitamin D serum values and rheumatoid arthritis disease activity (DA S28 ESR), a cross-sectional study. *Caspian J Intern Med* 2014;5:148-55.

19. Nielen MM, Van Schaardenburg D, Lems WF, Van De Stadt RJ, De Koning MH, Reesink HW, et al. Vitamin D deficiency does not increase the risk of rheumatoid arthritis: comment on the article by Merlino et al. *Arthritis Rheum* 2006;54:3719-20.
20. Al-Zifzaf DS, El Bakry SA, Mamdouh R, Shawarby LA, Ghaffar AYA, Amer HA, et al. FoxP3+ T regulatory cells in Rheumatoid arthritis and the imbalance of the Treg/TH17 cytokine axis. *Egypt Rheumatol* 2015;37:7-15.
21. Cao D, Malmström V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Europ J Immunol* 2003;33:215-23.
22. Van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS. CD4+ CD25+ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheumatol* 2004;50:2775-85.
23. El-Aziz GAA, Hussien NR, Nassib SA, El-Mohaseb GF. CD4+ CD25high FoxP3 expression in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *J Egypt Women Dermatol Soci* 2012;9:57-63.