

Vitamine D; De zonnige remedie tegen Multiple Sclerose?

Door Jette Lansink

Studentnr. 1861018

Begeleider prof. dr. P. Heeringa

Afdeling Pathologie en Medische Biologie

Juli 2012

Life Science & Technologie

Biomedische wetenschappen

Rijksuniversiteit Groningen



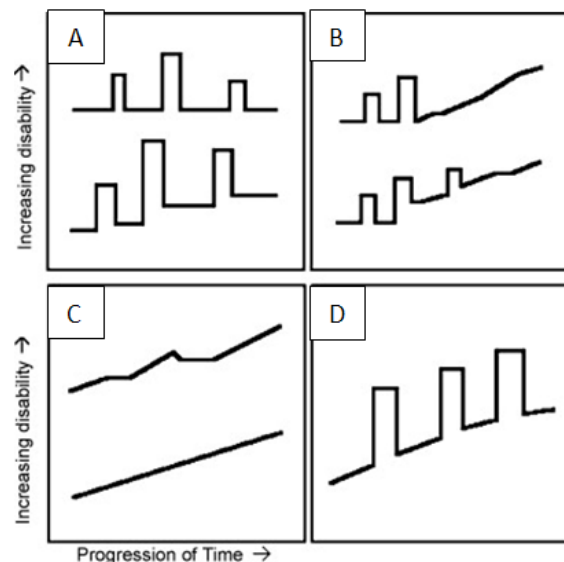
Abstract	Pagina 3
Inleiding: Multiple Sclerose	Pagina 3
Immunologische mechanismen Multiple Sclerose	Pagina 4
- Auto-immuniteit	Pagina 7
Risicofactoren ontwikkeling Multiple Sclerose	Pagina 7
Vitamine D	Pagina 8
- Metabolisme	Pagina 9
- Fysiologische Functies	Pagina 9
- Verband met MS	Pagina 10
Invloed vitamine D op immunologische processen MS	Pagina 11
- Th17, Th1, Th2 en Treg respons	Pagina 11
- Th17 cellen – VDR	Pagina 13
- Th17 cellen – CCR6	Pagina 13
- Overzicht	Pagina 14
Vitamine D suppletie	Pagina 14
- Onderzoek	Pagina 14
- Concentraties 25(OH)D	Pagina 15
- Leeftijd en Vitamine D suppletie	Pagina 15
Discussie	Pagina 16
Nawoord	Pagina 17
Referenties	Pagina 18

Abstract

Multiple Sclerose (MS) is een neurondegeneratieve auto-immuunziekte, waarbij demyelinisatie en axonale pathologieën ontstaan. Door een verschuiving van een Th2 naar een Th1 respons en de verminderde werking van regulatoire T- cellen worden meer pro-inflammatoire cytokinen geproduceerd dan anti-inflammatoire cytokinen. Een risicofactor voor MS is vitamine D deficiëntie, welke opgenomen kan worden via voedsel of aangemaakt in de huid onder invloed van UVB straling. In deze scriptie is de invloed van vitamine D op de cellulaire adaptieve immuun respons van MS onderzocht. Vitamine D verlaagt het risico op MS en inhibeert de progressie van MS, door de Th2 respons te stimuleren en de Th1 en Th17 respons te inhiberen. Tegenstrijdige resultaten worden gevonden over het effect van vitamine D op Treg activiteit. Nog veel mechanismen waarbij vitamine D de pathologie MS beïnvloedt zijn onbekend. Ook worden in onderzoeken waarbij vitamine D gesuppleerd wordt in MS patiënten tegenstrijdige resultaten gevonden. Vervolgonderzoek moet zich richten op de leeftijd- en dosisafhankelijke respons van vitamine D op het risico voor het ontwikkelen van en de progressie van MS.

Inleiding: Multiple Sclerose

Multiple Sclerose (MS) is een neurondegeneratieve auto-immuunziekte. Er treden ontsteking en demyelinisatie op in de witte stof van het centraal zenuwstelsel (CZS). Als gevolg hiervan ontwikkelen zich axonale pathologieën, waardoor er schade en verlies van axonen optreden. (Korn T. 2008, Bjartmar C. 1999). Myeline is de isolatielaag om zenuwen heen, welke zorgt voor een snelle geleiding van signalen door de zenuwen. Wanneer deze myelinelaa en de zenuw zelf worden beschadigd, resulteert dit in het minder goed functioneren tot disfunctioneren van de zenuw (Stichting MS research). Afhankelijk van het gebied van beschadiging treden neurologische disfuncties op, waaronder visuele en spraak gebreken, ataxie, motorische en sensorische beschadigingen, het ontbreken van coördinatie en incontinentie (Siffrin *et al.*, 2007). De term Multiple Sclerose duidt op de vele (multipelen) plaatsen waar verharding (sclerose) optreedt als gevolg van demyelinisatie van zenuwen (HGM Handboek). MS is de meest voorkomende neurologische ziekte in jong volwassenen. Het openbaart zich meestal tussen het 20e en 45e levensjaar en komt twee keer zo vaak voor bij vrouwen dan mannen. (Cree B.A.C., 2007) MS heeft in 85% van de gevallen in het begin van de ziekte een intermitterend verloop, waarbij perioden van goede gezondheid, remissies, worden afgewisseld met verergeringen, exacerbaties of relapses. Het lichaam repareert de beschadigingen die door de ontstekingen zijn ontstaan, waardoor het lijkt alsof de ziekte in aanvallen komt. Dit wordt relapsing remitting MS (RRMS) genoemd (figuur 1A). Wanneer het lichaam na de exacerbaties niet geheel kan herstellen treedt er geleidelijke achteruitgang op. Dit wordt secundair progressieve MS (SPMS) genoemd (figuur 1B). Bij 10% van de gevallen van MS treedt er vanaf de start van de ziekte al geleidelijke achteruitgang op, zonder exacerbaties en/of remissies. Dit wordt primair progressieve MS (PPMS) genoemd (figuur 1C). Bij 5% van de



Figuur 1. Weergave verloop van relapsing remitting MS (A), secundair progressieve MS(B), primaire progressieve MS(C) en progressieve-relapsing MS(D) (Zuvich *et al.*, 2009).

gevallen van MS komt progressieve -relapsing MS voor. Dit is een vorm waarbij vanaf het begin geleidelijke achteruitgang optreedt, met daarbij exacerbaties zonder remissies (figuur 1D) (Hauser *et al.*, 2008).

De diagnose multiple sclerose wordt gesteld op basis van aanwezigheid van 1 of meer van de volgende 3 factoren (Hauser *et al.*, 2008).

- Het hebben van ten minste twee verschillende lesions in de witte stof van het CZS.
- Het hebben van ten minste twee verschillende perioden tijdens het verloop van de ziekte.
- Het hebben van een chronische ontsteking in het CZS, bepaald door middel van CSF analyse.

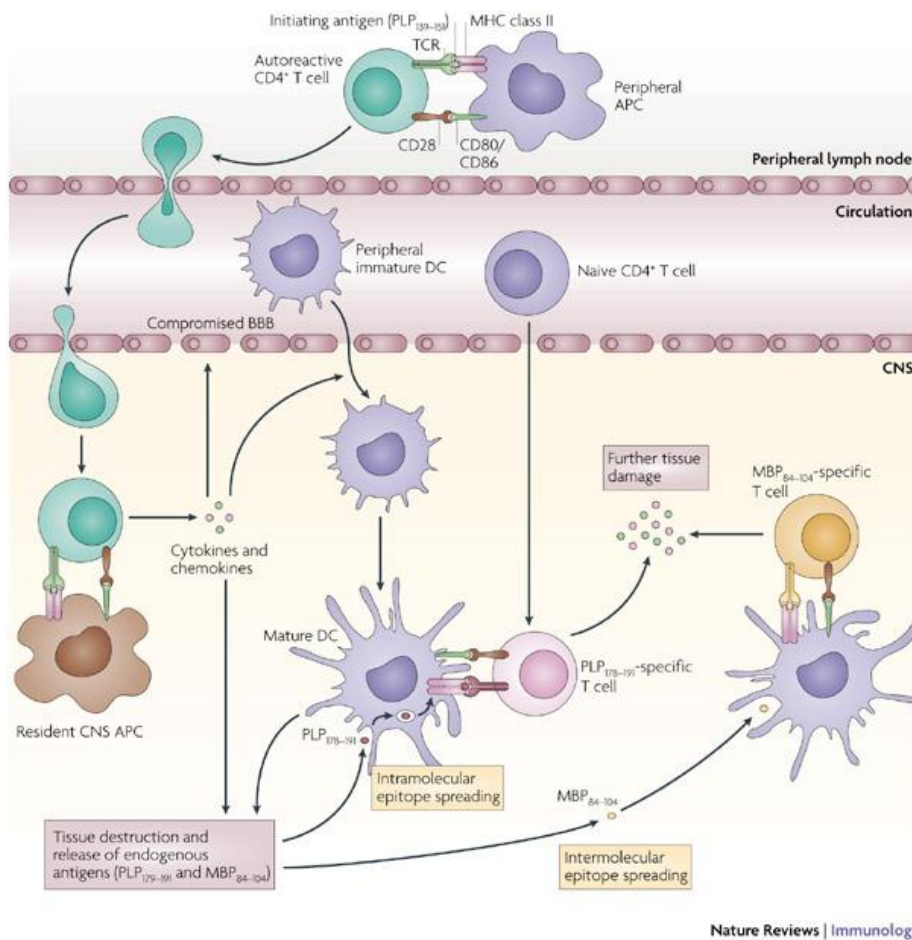
MS is een progressieve ziekte waar nog geen geneesmiddel voor is gevonden. Het doel van de vaak ingezette symptomatische behandeling van MS is het behouden van lichaamsfunctie en het verbeteren van de kwaliteit van leven. Er wordt gestreefd naar een verkorte duur en verlaagde frequentie van de exacerbaties, door corticosteroïden toe te dienen. Ook wordt interferon- β (IFN- β) toegediend om de progressie van de ziekte te verhinderen en de frequentie van exacerbaties met 18-38% te reduceren (Stachowiak J., 2008). IFN- β vermindert het aantal myeline reactieve T- cellen door de expressie van MHC-II en costimulatoire moleculen te inhiberen. Verder down- reguleert IFN- β de pro-inflammatoire T- cel respons en vermindert het de toegankelijkheid van T- cellen door de bloed-hersen barrière (Zhang X. *et al.*, 2010; Jiang H. *et al.*, 1995; Ozenci V. *et al.*, 2000).

Uit recent onderzoek is gebleken dat IFN- β therapie geassocieerd wordt met een verhoogde vitamine D productie in MS patiënten (Steward N. *et al.*, 2012). Het positieve effect van IFN- β op de progressie van MS zou gemoduleerd kunnen worden door verhoogde vitamine D concentraties in het serum. Ondanks de bevestigde positieve relatie tussen vitamine D serum concentraties en het risico op het ontstaan van MS en het verloop van MS, is nog niet exact bekend op welke wijzen vitamine D de pathogenese en pathologie van MS beïnvloedt. In deze scriptie wordt de invloed van vitamine D op de cellulaire adaptieve immuun respons van MS onderzocht.

Immunologische mechanismen Multiple Sclerose

MS speelt zich vooral af in de witte stof van het CZS. Hier treedt de afbraak op van myeline en oligodendrocyten, de myeline producerende cellen, waardoor de geleiding door de axonen wordt verminderd. Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) is een diermodel van een T- cel gemedieerde ontstekings en demyelinisatie auto-immuun ziekte van het CZS, welke vergelijkbaar is met MS. Deze hebben geholpen bij het in kaart brengen van het vermoedelijke mechanisme van lichaamsvreemde antigenen herkenning, de productie van antistoffen tegen autoantigenen en de productie van pro- en anti-inflammatoire cytokinen. In relapsing-remitting EAE worden autoreactieve CD4+ T- cellen geactiveerd in een lymfe knoop (figuur 2). Deze T- cellen verplaatsen zich via de bloedcirculatie naar het CZS (groene cellen in figuur 2). Eenmaal in het CZS worden de T- cellen geactiveerd door de aanwezige en infiltrerende antigen presenterende cellen (APC's) waardoor myelineafbraak wordt veroorzaakt. Cytokinen en chemokinen die geproduceerd zijn door T- cellen trekken meer immuun cellen aan het CZS in. Hierdoor wordt de permeabiliteit van de bloed-hersen barrière verhoogd. Naast de reactivatie van de antigen specifieke CD4+ T- cellen, worden ook myeline antigenen vrij gegeven, gefagocyteerd, geprocesseerd en in het CZS gepresenteerd door dendritische cellen (paars ruw), aan naïeve CD4+ T- cellen (paars egaal). Beide celtypen komen het CZS binnen door de bloed-hersen barrière. Wanneer bijvoorbeeld proteolipid protein (PLP) peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁ in een muis wordt gespoten en een aantal CD4+ T- cellen dit peptide herkennen, ontwikkelt zich de acute fase van de ziekte MS. Tijdens deze fase wordt myeline afgebroken en komen PLP en

myeline basic protein (MBP) vrij. Door deze antigen en CD4+ T- cel aanwezigheid, wordt de secundaire populatie PLP₁₇₈₋₁₉₁ specifieke T- cellen (roze) geactiveerd en treedt de primaire relapse

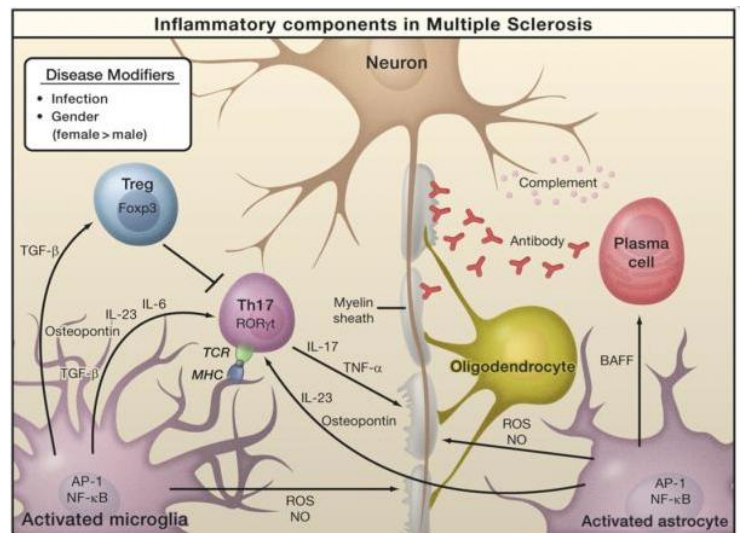


Figuur 2 Immuunreactie over bloed-hersen barrière. Uitleg zie tekst. APC; antigeen presenterende cel, BBB; bloed-hersen barrière, DC; dendritische cel, PLP; proteolipid protein, MBP; myelin basic protein. (Miller et al., 2007).

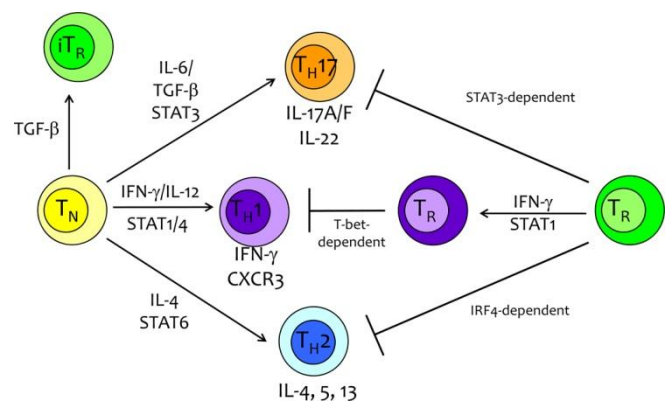
op, ook wel intramoleculaire epitooptreksing. Een epitooptreksing is de antigeen- antilichaam bindingsplaats. Bij epitooptreksing wordt niet het epitooptreksing waar de immuunreactie ingezet wordt (PLP₁₃₉₋₁₅₁), maar een epitooptreksing die secundair geactiveerd wordt door myeline afbraak (PLP₁₇₈₋₁₉₁) het belangrijkste doelwit van de immuun respons. Wanneer de auto-immuun respons zich verspreidt over verschillende epitopen op hetzelfde eiwit, wordt dit intramoleculaire epitooptreksing genoemd. Wanneer de auto-immuun respons zich verspreidt over andere structurele of functionele eiwitten, wordt dit intermoleculaire epitooptreksing genoemd (Powell AM., 2001). Deze laatste vorm van epitooptreksing treedt op wanneer de MBP₈₄₋₁₀₄ specifieke T- cellen (oranje) geactiveerd worden. Dit is de secundaire relapse, omdat deze respons later optreedt. Epitooptreksing wordt in EAE gereguleerd door CD28/B7 co-stimulatie. (Vanderlugt CL. et al., 1998; Miller et al., 2007).

Een van de belangrijkste onderdelen in de ontwikkeling van de pathologie van MS zijn de CD4+ T- cellen. Microglia zijn de macrofagen van het CZS, astrocyten zijn steuncellen tussen bloedvaten en zenuwen, welke het herstel van beschadigde neuronen stimuleren (Dhib-Jalbut et al., 2006). Na activatie differentieert de voorloper T- cel in een Thelper 1 cel (Th1) of een Thelper 2 cel (Th2). Th1 cellen scheiden pro-inflammatoire cytokinen uit zoals IFN- γ en TNF, Th2 cellen scheiden anti-inflammatoire cytokinen uit zoals IL-4 en IL-5 (Abbas et al., 2010). Deze onderdrukken de reactie die optreedt door pro-inflammatoire cytokinen. Ondanks dat beide typen aanwezig zijn, is MS een Th1 afhankelijke ziekte. Door de verschuiving van de Th-1/Th2 balans worden er meer pro-inflammatoire cytokinen geproduceerd waardoor de ontstekingsreactie wordt gestimuleerd. Door activatie van het ontstekingsproces en APC's nemen de adhesiemoleculen op het endotheel toe en wordt de bloed-hersen barrière meer permeabel. De beschermende functie gaat verloren en de migratie van cellen

en diffusie van pathogenen neemt toe. In MS patiënten is een verhoogde expressie van adhesiemoleculen VCAM-1 en ICAM aangetoond. Op de geactiveerde T- cellen wordt $\beta 1$ integrine very late antigen-4 (VLA-4) tot expressie gebracht (Abbas *et al.*, 2010), welke binden aan VCAM-1 op het endotheel. Ook wordt op T- cellen lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) tot expressie gebracht, welke binden aan ICAM op het endotheel. Op deze manier neemt de migratie van pathogeen-antigenen en T- cellen over de bloed-hersen barrière toe (Laman *et al.*, 2010). De T- cellen in het CZS activeren de astrocyten en microglia door middel van cytokinen zoals IFN γ (Hanisch U., 2002; Carpentier A. *et al.*, 2005). Via activatie van transcriptiefactoren Nfk- β en AP-1 in astrocyten en microglia, worden hier proinflammatoire cytokinen, NO en ROS uitgescheiden (figuur 3). Op die manier spelen ze een belangrijke rol bij de initiatie van de ziekte en het aanvallen van myeline (Lull. *et al.*, 2010). Enkele proinflammatoire cytokinen die worden afgegeven zijn IL-23 en osteopontin. Deze stimuleren een derde type T helper cel, Th17 cellen, welke een belangrijke pathogene rol in auto-immuunziekten en ontstekingsziekten inneemt. Deze pathogeniteit wordt bepaald door de cytokinen IL-17, IL-21 en IL-22 die door Th17 worden afgegeven (Zheng *et al.*, 2007). IL-17 is net als IL-21 en IL-22 een proinflammatoir cytokine. IL-17 zorgt voor een toename van expressie van inflammatoire genen in endotheelcellen, macrofagen en astrocyten. IL-17 concentraties zijn dan ook verhoogd in auto-immuunziekten als MS (Matusевичius *et al.*, 1999). IL-21 stimuleert de differentiatie in Th-17 cellen en reguleert de secundaire immuun respons in MS patiënten (Wei L. *et al.*, 2007; Jones J.L. *et al.*, 2009). IL-22 speelt een rol in chronische ontsteking maar heeft ook anti-inflammatoire effecten. (Beyeen AD. *et al.*, 2010; Monteleone I. *et al.*, 2011). Onder invloed van TGF- β kunnen CD4+ T- cellen in een vierde type T- cel differentiëren, de regulatoire T- cel (Treg). Treg's hebben anti-inflammatoire eigenschappen en kunnen de progressie van auto-immuunziekten tot stilstand brengen (Afzali *et al.*, 2007). Treg's activeren transcriptiefactoren welke invloed hebben op de Th1, Th2 en Th17 differentiatie en hoeveelheid cytokine productie ervan (figuur 4). Zo wordt bijvoorbeeld de transcriptie factor interferon regulatory factor 4 (IRF4) geproduceerd door Treg's. IRF4 heeft invloed op IL-4 productie van CD4+ T cellen en Th2 differentiatie. Wanneer IRF4 in muizen selectief wordt verwijderd in Treg's, ontwikkeld zich een toename van het aantal IL-4 en IL-5 producerende CD4+ T cellen. Op die manier zorgen Treg's voor de homeostase tussen de Th1, Th2 en Th17 immunologische respons (Campbell *et al.*, 2011). Bij MS patiënten worden minder goed werkende Tregs gevonden. De immunologische respons verschuift van Th2 naar Th1 respons, zodat T- cellen meer pro-inflammatoire cytokinen produceren (Smolders¹ *et al.*, 2010). Deze verschuiving kan verantwoordelijk zijn voor de ontwikkeling en/of progressie van auto-immuunziekten (Afzali *et al.*, 2007).



Figuur 3 Inflammatie proces in MS (Glass *et al.*, 2010).



Figuur 4 Differentiatie van natieve Th cellen in functionele effector typen (Th17, Th1, Th2, Treg) is afhankelijk van transcriptie regulatoren en TCR stimulatie in combinatie met cytokine signaling/STAT activatie. De inhibitie van de functionele effector typen door Treg is afhankelijk van specifieke moleculaire programma's (STAT3, T-bet, IRF4) (Campbell *et al.*, 2011).

Eerder werd beschreven dat een CD4+ T-voorloper cel het lichaamseigen myeline-antigen herkent. Waarom treedt deze auto-immuun reactie op? Normaal gesproken worden de auto-immune T-cellen opgespoord in de thymus. Zogenaamde 'thymocyten' ondergaan interacties met auto-antigen presenterende APC's. Wanneer de thymocyten zelf- reactief zijn, binden ze en worden ze geëlimineerd. Wanneer een zwakke binding optreedt, wordt het celtype veranderd of wordt de T- cel receptor (TCR) vernieuwd. Wanneer een thymocyt de ontmoeting met de APC's mist, kan het voorkomen dat er een auto-reactieve T- cel de periferie in komt. Daarom bevinden zich ook in de periferie meerdere systemen om de auto-reactieve T- cellen op te sporen, zodat de tolerantie voor myeline antigenen behouden blijft (Goverman J.M., 2011). Hoewel het ontstaan van MS nog onbekend is, wordt er vermoed dat een virale infectie in het CZS of de periferie een auto-immuun reactie kan induceren. Virussen kunnen structurele of moleculaire overeenkomsten hebben met verschillende antigenen van het CZS. Wanneer het virale antigen door een APC wordt gepresenteerd, activeert dit CD4+ T- cellen die niet alleen het virus binden, maar ook bepaalde CZS antigenen. Dit fenomeen wordt moleculaire mimicry genoemd, omdat de virale antigenen kruis- reageren met lichaamseigen antigenen (Abbas *et al.*, 2010; Glass *et al.*, 2010). Humane Herpes Virussen (HHV) veroorzaken latente infecties en zijn in staat tot reactivatie. Hieronder vallen het Hepatitis B virus (HBV), Varicella Zoster virus (VZV) en het Epstein Barr virus (EBV). Deze zouden een belangrijke rol kunnen spelen in de ontwikkeling van MS door middel van moleculaire mimicry (Christensen T., 2007). Een voorbeeld is het myelin basic protein (MBP) dat overeenkomsten heeft met een peptide uit HBV. Door moleculaire mimicry wordt niet alleen het HBV maar ook het MBP aangegrepen, waardoor MS ontstaat (Glass *et al.*, 2010).

Ook zou de auto-immuniteit te maken kunnen hebben met co-stimulatie tussen APC en CD4+ T- cel. Voor activatie van naïeve T cellen zijn minimaal twee signalen nodig. De TCR bindt aan het MHC/peptide complex van de APC. Hierdoor wordt de specificiteit van de immuun respons bepaald. Verder treedt er binding op tussen het B7 molecuul van het APC en het CD28 en CTLA-4 molecuul van de T- cel (Perrin *et al.*, 1999). De binding tussen het B7 molecuul en het CD28 is belangrijk voor de initiatie van de auto-immuun respons in EAE. De binding tussen het B7 molecuul en CTLA-4 zorgt voor down- regulatie van de immuun respons en zelf- tolerantie. Geactiveerde T- cellen zijn minder afhankelijk van costimulatie dan naïeve T- cellen. MBP- reactieve T- cellen in MS patiënten zijn dan ook minder afhankelijk van CD28 costimulatie dan controle groepen. Memory T- cellen zonder CD28 costimulatie in MS patiënten produceren grote hoeveelheden IFN- γ . Ook is de genexpressie van IFN- γ en IL-12R β 2, welke een belangrijke rol speelt in de differentiatie in Th1 cellen, toegenomen in de afwezigheid van costimulatie. De T- cellen zonder CD28 costimulatie vertonen een versterkte groei en hebben een verhoogde overleving na activatie. Dit doet vermoeden dat de T- cellen al eerder in het lichaam geactiveerd zijn geraakt, als onderdeel van de pathologie van MS (Racke *et al.*, 2000; Markovic-Plese *et al.*, 2001).

Risicofactoren ontwikkeling Multiple Sclerose

Er zijn meerdere factoren die het ontstaan en het verloop van de auto-immuniteit bij MS beïnvloeden. Deze veranderde immunologische reactie kan worden aangestuurd door omgevingsfactoren en genetische factoren. Er zal worden besproken welke omgevings- en genetische factoren een risicofactor kunnen zijn voor de ontwikkeling van MS.

Vrouwen hebben 2 tot 3 keer zoveel kans om MS te krijgen dan mannen. Dit is in overeenstemming met het feit dat vrouwen, vooral in de vruchtbare periode, meer kans hebben op het ontwikkelen

van auto-immuunziekten dan mannen. Echter moet er rekening gehouden worden met het feit dat hierbij het gebruik van de orale anticonceptiepillen en de toename vrouwelijke rokers niet is mee genomen, die respectievelijk de kans op MS verlagen en verhogen (Alonso *et al.* 2005; Ascherio *et al.*, 2007; Sundström *et al.*, 2008). Ook heeft de leeftijd waarop een virus wordt opgelopen invloed het ontstaan van MS. Wanneer een baby wordt geïnfecteerd met een virus geeft dit een beschermend effect tegen MS, echter wanneer door een jong volwassene een virus wordt opgelopen stijgt de kans in het ontstaan van MS (Ascherio *et al.*, 2007).

Ondanks dat MS wordt gezien als een niet-erfelijke ziekte, zal hier worden ingegaan op de genetische factoren die het ontstaan van MS promoten. Immers, een verwante van een MS patiënt heeft meer kans op het ontwikkelen van MS dan een niet- verwante. Het grootste risico op de vatbaarheid voor MS wordt toegekend aan het major histocompatibility complex (MHC) (Chao *et al.*, 2008). De haplotypen HLA-DRB1*1501 en HLA-DQB*0602 worden in meerdere populaties geassocieerd met MS (Oksenberg *et al.*, 2004). Toch bepalen deze typen maar 25 – 35% van de genetische componenten van MS (Dyment *et al.*, 2004). Andere niet- MHC genetische regio's die vatbaarheid voor MS impliceren zijn uitgezocht door genome-wide association studies (GWAS). Deze omvatten meer dan 20 loci waaronder *CD58*, *IL2RA*, *IL7R*, *CLEC16A*, *TNFRSF1A*, en *IRF*, welke een ondergeschikte rol in de vatbaarheid voor MS spelen (De Jager *et al.*, 2009; Lincoln *et al.*, 2009). Recente data suggereert dat de verschijnselen van MS naast specifieke antigen presentatie worden veroorzaakt door een combinatie van HLA-DR en HLA-DQ expressie van het MHC, en specifieke eigenschappen van allelen (Alcina *et al.*, 2012). Zo heeft het haplotype HLA-DRB1-15 meerdere effecten welke het risico op het ontwikkelen van MS vergroten. Een polymorfisme op positie 174 in de IL-6 promotor, welke zorgt voor een verhoogde productie van pro-inflammatoir cytokine IL-6, komt significant vaker voor in de aanwezigheid van HLA-DRB1-1501 (Shahbazi *et al.*, 2010). Ook bevindt zich binnen HLA-DRB1-15 een vitamine D response element (VDRE). De vitamine D receptor (VDR) bevindt zich veel in weefsels als de darmen, nieren, huid en schildklier. Nadat de VDR geactiveerd is door vitamine D, bindt het aan de VDRE op de promotor regio van HLA-DRB1-15. Op deze manier heeft de omgevingsfactor vitamine D door middel van de VDR en de VDRE op promotor regio HLA-DRB1-15 invloed op de transcriptie van genen en de ontwikkeling van MS (Ramagopalan *et al.*, 2009; Haussler *et al.*, 2008). De VDR is betrokken bij mineraal en bot homeostase, cardiovasculaire processen, kanker preventie en de regulatie van de immunologische respons (Holick M.F., 2010). In een Australische MS/controle populatie werd de VDR gen variatie bepaald door middel van 3 polymorfismen (Apa1, Taq1, Fok1). De genotype distributie van Apa1 en Taq1 werden significant meer geassocieerd met MS dan met de controle groepen. De associaties zijn het sterkst in de progressieve vormen van MS, secundair progressieve MS en primair progressieve MS. Deze resultaten suggereren dat het VDR gen en de aanwezigheid van vitamine D zelf een rol spelen in de kans op het ontstaan van MS (Tajouri *et al.*, 2005). Het aantal studies naar genen gerelateerd aan de productie van vitamine D in MS patiënten, is de afgelopen jaren gestegen (Simon *et al.*, 2012). Het CYP27B1 gen codeert voor het 1- α hydroxylase enzym en speelt een rol in het productieproces van vitamine D in ons lichaam. Er zijn 5 zeldzame mutaties gevonden van dit gen. MS patiënten bezitten significant meer mutaties in dit gen dan controle groepen. Deze resultaten impliceren wederom dat vitamine D deficiëntie als risicofactor kan worden gezien voor de ontwikkeling van MS (Munger *et al.*, 2006).

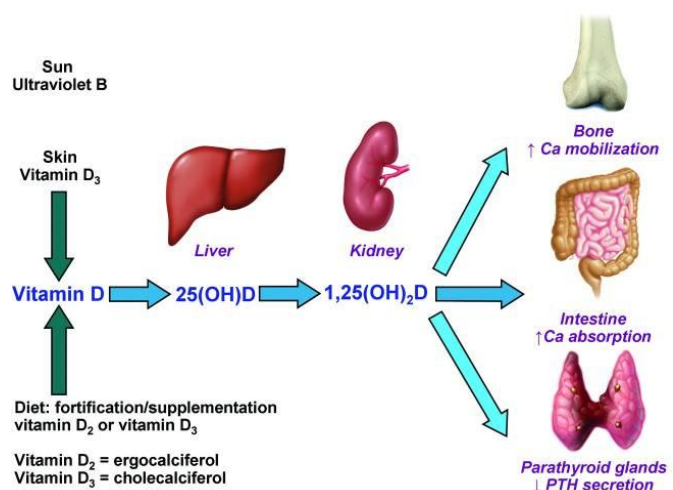
Vitamine D

Er is uitgewezen dat het risico op het ontwikkelen van MS toeneemt naarmate de breedtegraad van de aarde toeneemt. De gerelateerde ultraviolet (UV) straling neemt hierbij af (Ramagopalan *et al.*, 2008; Ascherio¹ *et al.*, 2010). MS komt vooral voor in de gematigde klimaten. Personen in de westerse wereld boven de 40^e breedtegraad, zoals, zoals de Verenigde Staten, Canada, Europa,

Nieuw Zeeland en delen van Australië, hebben een hoger risico op de ontwikkeling van MS dan in equatoriale gebieden. De incidentie ligt in deze hoge risicogebieden tussen 0.1 en 0.2%. In gebieden met een lager risico zoals Azië, Afrika en Zuid-Amerika, ligt de incidentie maar rond 0.005% (Kantarci *et al.*, 2006). Men zou kunnen vermoeden dat dit verschil in incidentie te verklaren is door middel van genetische variatie. Echter, niet alleen de woonplaats op aarde heeft een verband met de MS incidentie, maar ook het verschil in tijd dat de huid wordt blootgesteld aan de zon en het verschil in samenstelling van het voedsel hebben hier invloed op. Het blootstellen van de huid aan UV straling en het eten van visolie hebben een beschermend effect tegen MS (Ebers G.C., 2008). Er wordt vermoed dat dit effect wordt veroorzaakt door vitamine D (Ebers G.C., 2009), dat in de huid geproduceerd wordt onder invloed van UV straling en aanwezig is in visolie. Op die manier beïnvloed vitamine D het risico op MS. Deze hypothese wordt ondersteund door een studie waaruit blijkt dat een laag serum level van 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D), de circulatievorm van vitamine D, geassocieerd is met een hoger risico op MS (Munger *et al.*, 2006).

Metabolisme

Er zijn twee vormen van vitamine D, vitamine D₂ en vitamine D₃, respectievelijk ook wel ergocalciferol en cholecalciferol genoemd. Vitamine D₃ wordt geproduceerd in de huid en kan worden opgenomen uit voedsel, zoals vette vis, eigeel en lever. Vitamine D₂ komt voor in enkele planten en wordt geproduceerd bij de natuurlijke bestraling van plankton. De UVB straling vanuit het zonlicht zet het 7-dehydrocholesterol in de huid om in previtamine D₃. Previtamine D₃ wordt onmiddellijk omgezet in vitamine D₃. Het vitamine D₂ en D₃ vanuit de voeding wordt via de darm opgenomen de bloedsomloop in. Beide vormen van vitamine D ondergaan verder hetzelfde metabolisme. Deze voorlopers worden in de lever omgezet in 25(OH)D (figuur 5). Bij



Figuur 5 Vitamine D metabolisme (Thacher *et al.*, 2011)

het bepalen van de hoeveelheid van vitamine D in het bloed, wordt het serum level van deze metaboliet van vitamine D gemeten. Echter, dit is nog een biologische inactieve vorm van vitamine D. In de nier wordt 25(OH)D gehydroxyleerd door een mitochondriaal cytochroom P450 enzym, 25(OH)D-1 α -hydroxylase (Hewison *et al.*, 2000). Dit enzym wordt gecodeerd door het CYP27B1 gen. Na hydroxylatie van 25(OH)D is 1,25-dihydroxyvitamine D, ofwel 1,25(OH)₂D, tot stand gekomen. Dit is de enige actieve vorm van vitamine D (Thacher *et al.*, 2011; DeLuca H.F., 2004).

Fysiologische Functies

De eigenschappen van 1,25(OH)₂D zijn vergelijkbaar met die van een hormoon. De structuur is verwant aan die van steroïde hormonen en zolang er voldoende UVB straling ter beschikking is wordt 1,25(OH)₂D door het lichaam zelf geproduceerd. Dit maakt van vitamine D een prohormoon in plaats van een vitamine (Thacher *et al.*, 2011). Door vitamine D worden de plasma concentraties calcium constant gehouden, en het let op de bot mineralisatie. Vitamine D verhoogt plasma calcium concentraties op drie manieren (figuur 5). Ten eerste zorgt vitamine D voor het mobiliseren van calcium van bot naar het plasma, wanneer er niet via de darm calcium opgenomen kan worden het bloed in. Vitamine D stimuleert osteoblasten, welke botopbouwend zijn, om receptor activator nuclear factor- κ B ligand (RANKL) te produceren. RANKL stimuleert osteoclastogenese en activeert rustende osteoclasten, welke botafbraak stimuleren (Suda *et al.*, 2003). *In vivo* is voor deze

mobilisatie van bot naar plasma niet alleen vitamine D, maar ook parathyroïd hormoon nodig (Garabedian *et al.*, 1972). Ten tweede stimuleert vitamine D eiwitten in de darm die betrokken zijn bij actieve calcium opname. Ook stimuleert het de fosfaat absorptie in de darm (Suda *et al.*, 2003). Ten derde wordt de synthese van 1,25(OH)₂D nauwkeurig gereguleerd en gestimuleerd door het parathyroïd hormoon (PTH), welke wordt geproduceerd door de bijschildklier. Wanneer de plasma concentratie calcium of fosfaat dalen onder normaalwaarden en er hierdoor behoefte is aan calcium absorptie, signaleren de calcium-gevoelige eiwitten in de bijschildklier dit. Hierdoor stimuleren deze transmembraaneiwitten de activiteit van de bijschildklier en de secretie van het PTH (Alcina *et al.*, 2012). Door de toename van PTH neemt de hoeveelheid 1,25(OH)₂D toe, zodat calcium wordt geabsorbeerd. Ook in de renale tubule zijn 1,25(OH)₂D en PTH verantwoordelijk voor het stimuleren van de reabsorptie van het gefilterde calcium (Yamamoto *et al.*, 1984). Echter, wanneer er voldoende 1,25(OH)₂D aanwezig is en er dus voldoende calcium absorptie heeft opgetreden waardoor de plasma concentratie calcium hoog genoeg is en de drempelwaarde niet wordt overschreden, neemt de activiteit van de bijschildklier af, en daalt de hoeveelheid PTH (Brown *et al.*, 1993). Wanneer de plasma concentratie calcium te hoog is, produceert de schildklier calcitonine, welke de calcium mobilisatie vanuit bot blokkeert (Chambers *et al.*, 1982).

Verband met Multiple Sclerose

Zoals hierboven uiteen is gezet en uit meerdere onderzoeken blijkt (Munger *et al.*, 2006; Kragt *et al.*, 2009; Correale *et al.*, 2011), zou een lage concentratie vitamine D in de bloedsomloop een risico kunnen vormen voor de pathogenese van MS. Munger *et al.* heeft de 25(OH)D waarden van militairen van de Verenigde Staten geanalyseerd voordat de eerste MS symptomen bij enkele militairen werden gevonden. Uit deze studie bleek dat bij blanken met verhoogde 25(OH)D waarden een significant lager risico op MS hadden. Wanneer er een verlaagde 25(OH)D werd gevonden uitte dit zich, vooral bij mannen onder de 20, in een hoger risico op MS (Munger *et al.*, 2006). De concentratie vitamine D in de bloedsomloop zou dus een beschermend effect tegen MS of verhoogd risico op het ontstaan van MS met zich mee kunnen brengen. Toch werd in dezelfde studie van Munger *et al.* geen significante associaties gevonden tussen vitamine D en MS in zwarten of Spanjaarden. Dit zou te maken kunnen hebben met verschillende immunologische mechanismen tussen etnische groepen en een verschillende mate van UVB opname in donkere huid. Een aansluitende vraag op deze onderzoeksresultaten is, of dan ook alle MS patiënten gemiddeld lagere 25(OH)D waarden in hun bloedsomloop hebben dan controle groepen. Het antwoord hierop kan met 'ja' beantwoord worden (Ascherio² *et al.*, 2010). De gedaalde 25(OH)D waarden hoeven echter niet voor het ontstaan van de ziekte al aanwezig te zijn, ze kunnen ook ontwikkeld zijn door de aanpassingen van levensstijl die de ziekte met zich meebrengt. De 25(OH)D waarden zijn namelijk stabiel voor de eerste symptomen opgemerkt worden (Munger *et al.*, 2006). De concentratie vitamine D in de bloedsomloop zou niet alleen het risico op MS kunnen bepalen, maar ook het verloop van de ziekte. In een onderzoek waarbij het bloed van 73 relapsing-remitting MS patiënten is onderzocht, is een relatie gevonden tussen de 25(OH)D waarden en de exacerbatie frequentie. Het risico op exacerbaties nam significant af, wanneer de 25(OH)D waarden hoog waren (Runia *et al.*, 2012). Ook de progressie van de MS neemt af naarmate de vitamine D concentraties hoog zijn. Hoge 25(OH)D waarden zijn significant gecorreleerd aan een daling in Multiple Sclerose Severity Score (MSSS), een maat voor de ernstigheid van de ziekte. Ondanks de positieve relaties die bevestigd zijn, is er nog niet exact bekend op welke manier vitamine D de pathogenese van MS beïnvloed. In deze scriptie zal verder worden beschreven op welke manier immunologische mechanismen die een rol spelen bij de pathogenese van MS worden beïnvloed door vitamine D. Hierbij zal worden ingegaan op het cellulaire adaptieve immuunsysteem.

De actieve metaboliet van vitamine D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, heeft *in vitro* immuun modulerende eigenschappen. Jeffery *et al.* en Smolders *et al.* spreken elkaar tegen over het inhiberende effect van $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ op de CD4+ T-cel proliferatie. Wel zijn ze eenstemmig over het inhiberende effect van $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ op de pro-inflammatoire cytokine productie zoals IFN- γ , en IL-17 (Smolders *et al.*, 2008; Jeffery *et al.*, 2009). Hierdoor wordt de ontstekingsreactie die optreedt bij MS geremd en wordt de expressie van inflammatoire genen in endotheelcellen, macrofagen en astrocyten verminderd. Verder stimuleert $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ anti-inflammatoire cytokine productie (IL-4 en IL-10), waardoor de pro-inflammatoire cytokinen worden onderdrukt en de ontstekingsreactie wordt geremd (Opal *et al.*, 2000). Door de minder goed functionerende Treg's bij MS patiënten, wordt er een verschuiving waargenomen richting de pro-inflammatoire Th1 respons (Smolders¹ *et al.*, 2010). Na suppletie van 1000 UI vitamine D₃ per dag, 6 maanden lang, is de concentratie 25(OH)D en TGF- β bij MS patiënten *in vivo* toegenomen (Mahon *et al.*, 2003). TGF- β stimuleert de differentiatie van CD4+ T-cellen in Treg's. De ontstekingsremmende capaciteit van Treg's nam toe, in tegenstelling tot het aantal Treg's in circulatie (Smolders² *et al.*, 2010). Deze resultaten waren onafhankelijk van effecten die vitamine D heeft op calcium homeostase. Het onderzoek door Kimall *et al.* waarbij een stijgende dosis vitamine D₃ (40.000 – 400.000 UI per dag) werd toegediend heeft aangetoond dat MS geassocieerde T-cel reactiviteiten *in vivo* werden onderdrukt door vitamine D (Kimball *et al.*, 2011). Vitamine D grijpt dus wel degelijk aan op de immunologische reacties die optreden tijdens de pathologie van MS. Hieronder zullen de gevonden mechanismen worden besproken welke geïnitieerd worden door vitamine D en invloed hebben op de veranderde immunologische reactie bij MS.

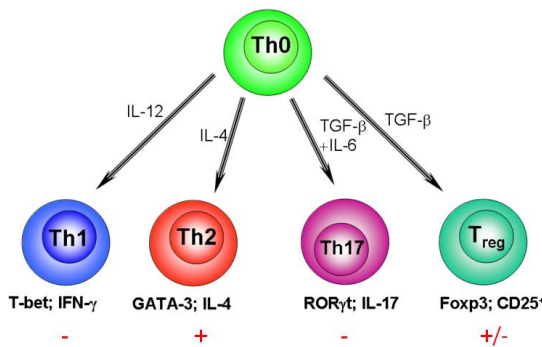
Th17, Th1, Th2 en Treg respons

In het onderzoek van Sloka *et al.* werden humane T cellen behandeld met 0.1 tot 10 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Sloka *et al.*, 2011). Interferon- γ (IFN- γ) representeert de Th1 respons, IL-5 representeert Th2 respons IL-4 in figuur 6) en IL-17 representeert Th17 respons (figuur 6). In tegenstelling tot de resultaten die Jeffery *et al.* verkregen, waarbij de cytokine productie van IL-17 afnamen na toediening van $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, waren bij Sloka *et al.* de concentraties IFN γ en IL-17 niet consistent met de toenemende concentratie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Ze bleken erg variabel, ze nemen toe, nemen af of blijven onveranderd. De IL-5 productie daarentegen neemt toe naarmate de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ concentratie toe neemt. Dit resulteert in een toename van de concentratie IL-5 ten opzichte van IFN γ of IL-17 concentraties. Specifieke transcriptiefactoren sturen de Th respons aan. TBX21 representeert Th1 (T-bet in muizen en in figuur 6), GATA binding protein-3 (GATA-3) representeert Th2 en RAR-related orphan receptor C (RORC) representeert de formatie van Th17 cellen. Net als de resultaten hierboven, neemt na toenemende concentratie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de hoeveelheid GATA-3 toe en zijn de levels TBX21 en RORC erg variabel. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zorgt dus voor een toename GATA-3 vergeleken met TBX21 en RORC. Beide resultaten geven weer dat $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de Th2 respons bevoordeeld op de Th1 en Th17 respons.

CD25 komt tot expressie op Treg's. Door de aanwezigheid van transcriptiefactor Foxp3, krijgen de Treg's hun immuun onderdrukkende effect. Chang *et al.*, heeft het effect van $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ op CD4+ T-cellen onderzocht. Hij vond gedaalde mRNA waarden van Foxp3 en afgenomen expressie van Foxp3. Dit wijst uit dat $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ een inhiberend effect heeft op de Treg activiteit. Hieruit blijkt dat vitamine D wat betreft de Treg's geen positief, maar juist een negatief effect heeft op MS. Wanneer T-cellen geïsoleerd werden uit VDR deficiënte muizen, werden deze resistent tegen het inhiberende effect van $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Hieruit blijkt dat voor de down-regulatie van Treg's door middel van $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de VDR onmisbaar is. Ook remt vitamine D de productie van IL-2, welke nodig is voor de differentiatie in Treg's. Door recombinant IL-2 toe te voegen bij de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ behandelde CD4+ T-cellen, nemen de aantallen Treg's weer toe. Dit geeft aan dat down-regulatie van Treg differentiatie

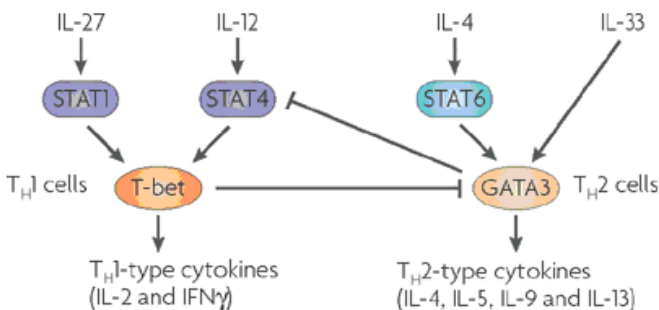
door 1,25(OH)₂D₃ afhankelijk is van de lage IL-2 productie (Chang *et al.*, 2010). Andere studies vinden tegenstrijdige resultaten. Zoals eerder genoemd vond Smolders² *et al.*, in vivo een toenemende ontstekingsremmende capaciteit van de Treg's, maar nam het aantal Treg's in circulatie af na suppletie van dagelijkse vitamine D₃ (Smolders² *et al.*, 2010). Correlae *et al.*, vond daarentegen na suppletie van 1,25(OH)₂D₃ ex vivo een toename in aantal Treg's en een toegenomen IL-10 productie (Correale *et al.*, 2009). Dit verschil in toename van Treg's zou kunnen liggen aan de verschillende methoden die gebruikt zijn. Smolders werkte *in vivo*, terwijl Correale zijn resultaten behaalde uit *ex vivo* onderzoek. Ook al worden er nog tegenstrijdige resultaten gevonden, wordt er steeds meer aandacht geschonken aan de regulerende rol van de Treg's in auto-immuunziekten.

Effect van vitamine D:



Figuur 6 Differentiatie van verschillende T- cellen vanuit Th0 cel, onder invloed van cytokinen. Transcriptiefactoren en geproduceerde cytokinen per celtype (Kantokano, 2006).

Omdat bij het onderzoek van Sloka *et al.*, IL-5 en GATA-3 zijn verhoogd bij toegenomen 1,25(OH)₂D₃ concentraties, wordt het mechanisme dat voor toename van GATA-3 zorgt verder onderzocht. Expressie van GATA-3 kan worden verhoogd door signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) en Notch1. Na behandeling van perifere mononucleaire bloedcellen (PBMC's) met 1 nM 1,25(OH)₂D₃, nam de ratio STAT6 t.o.v. TBX21 toe, de ratio GATA-3 t.o.v. TBX21 toe en de ratio Notch1 t.o.v. TBX21 bleef constant. Deze resultaten geven aan dat 1,25(OH)₂D₃ werkt door middel van STAT6, die GATA-3 concentraties verhoogd (figuur 7). Notch1 levert hier geen bijdrage aan. Wanneer STAT6 inactief wordt gemaakt in EAE muizen, treedt er geen toename van GATA-3 meer op t.o.v. T-bet (de transcriptiefactor van muizen vergelijkbaar met TBX21). Dit levert nogmaals het bewijs dat STAT6 nodig is om het therapeutische effect van 1,25(OH)₂D₃ te bereiken (Sloka *et al.*, 2011).



Figuur 7 Regulatie van transcriptiefactoren GATA3 en T-bet. De transcriptiefactor GATA3 wordt via STAT6 gereguleerd door IL-4. Ook IL-33 beïnvloedt de activiteit van GATA3. GATA3 reguleert de expressie van IL-4, IL-5, IL-9 en IL-13 van Th2 cellen en inhibeert de expressie van T-bet via STAT 4. T-bet wordt beïnvloed via STAT1 en STAT4 respectievelijk door IL-27 en IL-12. T-bet reguleert de expressie van IL-2 en TFN γ van Th1 cellen en inhibeert GATA3 (Barnes P.J., 2008).

intrinsieke en extrinsieke cellulaire factoren. De transcriptiefactor T-bet (in muizen) is daar er een van, wanneer deze geactiveerd wordt door IL-12 of IL-27 (figuur 7). In het onderzoek van Daniel *et al.* werden muizen behandeld met trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-colitis, zodat ze eigenschappen openbaarden die lijken op Th-1 auto-immuunziekten (Daniel *et al.*, 2008). Wanneer deze muizen dexamethasone (immuun onderdrukkend middel) in combinatie met $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kregen toegediend, nam de T-bet expressie significant af vergeleken met wanneer alleen dexamethasone werd toegediend. In dit onderzoek heeft $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in tegenstelling tot het onderzoek van Sloka *et al.*, een inhiberend effect op de Th1 respons. Ook Guillot *et al.*, geeft aan dat $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de Th1 respons indirect beïnvloedt door de inhibitie van IL-2 (Guillot *et al.*, 2010). Het valt op dat de methode van Sloka *et al.*, anders is dan die Daniel *et al.* Sloka *et al.*, werkt *in vitro* met gezonde humane T- cellen, terwijl Daniel *et al.*, *in vivo* werkt met muizen waarin zich een Th-1 auto-immuunziekte manifesteert. Het verschil in gebruik van humane cellen of muizen cellen na suppletie van $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zal niet zozeer het verschil maken in de Th1 respons. Er wordt namelijk al jaren gebruik gemaakt van het dierlijke EAE model, dat vergelijkbaar is met de pathologie die optreedt in mensen met MS. Er wordt verondersteld dat de effecten die vitamine D heeft op het immuunsysteem van de muis overeenkomstig zijn met die van de mens. Aanpassingen in het immuunsysteem bij mensen door de ziekte MS, zullen vergelijkbaar zijn in muizen door het geïnitieerde EAE. Muizen maken geen vitamine D aan in hun huid zoals mensen, omdat ze geen zonlicht zien. Muizen verkrijgen hun vitamine D uit voedsel, welke gelijk is aan vitamine D aangemaakt in de huid (Thacher *et al.*, 2011). Hier zullen dus geen grote verschillen het gevolg van zijn. Wel zou de tegenstelling *in vitro*, *in vivo* een verschil kunnen maken in de resultaten die gevonden zijn. Maar ik verwacht dat het verschil in gebruik van zieke en gezonde cellen het grootste effect zal hebben op de verschillende Th1 respons na toediening van $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Hier zou namelijk de immuun respons af kunnen wijken. Dit zou ook het verschil verklaren in Th17 respons die Jeffery *et al.* en Sloka *et al.* vonden. Jeffery *et al.* heeft de Th17 respons bepaald in MS patiënten, terwijl Sloka *et al.* hier gezonde humane cellen voor heeft gebruikt.

Th17 cellen - VDR

De biologische acties van vitamine D worden gemedieerd door de VDR (Chang *et al.*, 2010). Ook wordt de VDR expressie geïnduceerd door $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in zowel geactiveerde als rustende cellen. Vitamine D verlaagd het aantal IL-17 producerende cellen (Correale *et al.*, 2009). Om te onderzoeken of de down- regulatie van Th17 cellen onder invloed van $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ook gemedieerd wordt door de VDR, heeft Chang *et al.* muizen gebruikt met deficiënte VDR. Zoals verwacht beïnvloedde de deficiëntie an sich de Th17 differentiatie niet, omdat zonder VDR geen inhiberend effect door middel van vitamine D op zal kunnen treden. Wel werden de cellen met VDR deficiëntie resistent tegen het inhiberende effect dat $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ op Th17 cellen heeft. Hieruit blijkt dat de VDR op geactiveerde CD4+ T- cellen essentieel is voor de down- regulatie van Th17 cellen door middel van $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Chang *et al.*, 2010).

Th17 cellen – CCR6

Chemokine receptor 6 (CCR6+) T- cellen spelen een essentiële rol in de toegankelijkheid van Th17 cellen het CZS in, waardoor EAE wordt gemedieerd (Reboldi *et al.*, 2009). Door het toevoegen van $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aan geactiveerde MOG- specifieke CD4+ cellen, nam de expressie van CCR6 af. *In vivo* nam de migratie van $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ behandelde cellen richting Macrofaag Inflammatory Protein-3 α (MIP-3 α /CCL20) af (Chang *et al.*, 2010). MIP-3 α /CCL20 is verhoogd in het CZS tijdens de pathogenese van EAE (Kohler *et al.*, 2003). Hieruit blijkt dat vitamine D de CCR6 expressie op Th17 cellen inhibeert, waardoor de migratie van Th17 cellen het CZS in verminderd wordt.

Overzicht

Samenvattend kan gesteld worden dat $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ een inhiberend effect heeft op de productie van pro-inflammatoire cytokinen en een stimulerend effect heeft op de productie van anti-inflammatoire cytokinen. De Th2 respons wordt gestimuleerd door $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ via STAT6 die transcriptiefactor GATA3 tot uiting brengt (figuur 6). De Th1 respons die gestuurd wordt door transcriptiefactor T-bet zou door $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gehinibeerd kunnen worden, maar hier is men niet unaniem over. De IL-17 producerende cellen van de Th17 respons, gestuurd door RORC, zouden door middel van $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gehinibeerd kunnen worden, maar ook hier is men niet onverdeeld over. De Treg activiteit kan door $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ worden verminderd door een afname in expressie van transcriptiefactor Foxp3 en verminderde IL-2 productie. Andere studies wijzen uit dat de Treg activiteit en/of het aantal Treg cellen juist toeneemt door $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. De VDR is essentieel voor de down regulatie van Th17 cellen en Treg's door middel van $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Verder inhibeert $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de CCR6 expressie op Th17 cellen, waardoor de migratie van Th17 cellen naar het CZS afneemt.

Vitamine D suppletie

Veel immunologische mechanismen spelen een rol bij het ziekteproces van MS en kunnen beïnvloed worden door vitamine D. Het zou fantastisch zijn wanneer door middel van toevoeging van supplement vitamine D aan personen met een lage $25(\text{OH})\text{D}$ waarde, hetzelfde beschermende effect tegen MS en verminderde exacerbaties bereikt zullen worden als bij de al aanwezige hoge beschermende $25(\text{OH})\text{D}$ waarden in het bloed. Of daadwerkelijk in de praktijk suppletie van vitamine D zinvol is en dit de schadelijke immunologische mechanismen die optreden bij MS kunnen inhiberen, zal hieronder worden besproken.

Onderzoek

Kimball *et al.* vond door middel van een onderzoek waarin 49 proefpersonen participeerden een relatie tussen vitamine D_3 suppletie en een afname van abnormale PBMC reactiviteit, zoals tegen antigen MBP, in patiënten met MS (Kimball *et al.*, 2011). De patiënten kregen een toenemende dosis vitamine D_3 (4.000-40.000 IU/d) toegediend, gevolgd door een dosis van 10.000 IU/d, waarbij 40 international units (IU) gelijk staat aan 1 microgram. Daarbij kregen ze calcium (1200 mg/d). Na een jaar waren de serum concentraties $25(\text{OH})\text{D}$ van de controle proefpersonen 83 ± 35 nmol/liter en van behandelde proefpersonen 179 ± 76 nmol/liter. Dus abnormale T- cel reactiviteiten, welke geassocieerd worden met exacerbaties, werden onderdrukt door vitamine D_3 in serum concentraties hoger dan 100 nmol/liter (Kimball *et al.*, 2011). In het onderzoek van Burton *et al.*, waarin ook 49 proefpersonen participeerden, kregen de patiënten 28 weken een toenemende dosis vitamine D_3 tot aan 40.000 UI/d, gevolgd door 12 weken 10.000 IU/d. De resterende 12 weken werd geen vitamine D toegediend. Gedurende het jaar werd calcium (1200 mg/d) toegediend. De exacerbatie frequentie in behandelde patiënten daalde met 41%, terwijl de exacerbatie frequentie in de controle groep daalde met 17%, niet significant. Ook is er een Expanded Disability Status Scale (EDSS) meting gedaan, een schaal waarop de mate van invaliditeit wordt bepaald aan de hand van neurologische achteruitgang. Hier werd geen significante verbetering gevonden bij zowel de controle als behandelde groep. De T-cel proliferatie respons daalde significant in de behandelde groep, in tegenstelling tot de controle groep. Het grootste deel van de personen met een gedaalde T- cel proliferatie respons had een serum concentratie $25(\text{OH})\text{D}$ van >100 nmol/liter. (Burton *et al.*, 2010). Kampman *et al.* vond daarentegen geen verminderde MS progressie na behandeling met vitamine D_3 . Er is met behulp van 68 proefpersonen onderzoek gedaan naar het effect van $25(\text{OH})\text{D}$ suppletie op exacerbatie frequentie, EDSS en Multiple Sclerosis functional composite (MSFC), een test waarin loop, arm en cognitieve functies worden gemeten. De suppletie van wekelijks 20.000 UI vitamine D_3 tot aan een

serum 25(OH)D van 121 nmol/liter resulteerde niet in een verminderde progressie van MS (Kampman *et al.*, 2012). Het is onduidelijk waarom Kampman *et al.* geen positieve resultaten verkreeg na suppletie van vitamine D₃ en Kimball *et al.* en Burton *et al.* wel. Ze verkregen na het toedienen van verschillende concentraties met verschillende frequenties vitamine D₃, dezelfde serum concentratie 25(OH)D van > 100 nmol/liter. Dus het suppleren van in verschillende frequenties en concentraties vitamine D₃, zou geen verschillende resultaten met zich mee hoeven brengen. Kampman *et al.* heeft een andere methode gebruikt om het effect van 25(OH)D op patiënten te meten dan Kimball *et al.* Kampman *et al.* en Burton *et al.* hebben de effecten van 25(OH)D op respectievelijk de abnormale T- cel reactiviteit en T- cel proliferatie respons bestudeerd, waar positieve resultaten werden gevonden. Kimball *et al.* en ook Burton *et al.* hebben daarentegen het effect van 25(OH)D op de klinische uitkomsten bestudeerd, zoals de EDSS en vonden geen positieve resultaten. Mogelijk heeft 25(OH)D effect op de T- cel respons, maar uit dit zich niet altijd in klinische verschijnselen. Verder is niet duidelijk of Kampman *et al.* wel calcium heeft toegediend aan zijn behandelde groep zoals Kimball *et al.* en Burton *et al.* hebben gedaan.

Concentraties 25(OH)D

Omdat het toedienen van erg verschillende hoeveelheden vitamine D₃ leiden tot relatief vergelijkbare concentraties 25(OH)D in het serum, is het interessant te weten hoeveel vitamine D normaal gesproken nodig is om een gezonde concentratie 25(OH)D in het serum te bereiken. De referentie waarden 25(OH)D die worden aangenomen als gewenst, zijn verschillend per ziekenhuis. Gemiddeld wordt een waarde van 90 tot 150 nmol/liter als voldoende gezien. Dit kan worden bereikt door de aanbevolen dagelijkse hoeveelheid vitamine D in te nemen, en het door middel van UVB straling aanmaken van vitamine D. Deze hoeveelheid voor volwassenen in Nederland is 800-1000 IU per dag (Dawson-Hughes *et al.*, 2005). De huid van ouderen is minder goed in staat vitamine D te produceren, doordat 7-dehydrocholesterol niet goed wordt omgezet in previtamine D₃. Daarom zullen zij meer vitamine D₃ door middel van voeding of supplement op moeten nemen, wel 2000 UI per dag (Vieth R., 1999). Wanneer door langdurige vitamine D₃ suppletie de serum concentratie 25(OH)D tot boven 10.000 UI stijgt, kan hypercalciemie optreden (Muskiat F.A. *et al.*, 2007). Doordat calcium wordt onttrokken vanuit bot en opgenomen vanuit de darmen, stijgt de bloed waarde van calcium ten opzichte van normaalwaarden en hypercalciurie kan een gevolg zijn. Symptomen die hierdoor kunnen optreden zijn maag darm klachten, verminderde eetlust, obstipatie of diarree (HGM Handboek, 2009).

Leeftijd en vitamine D suppletie

De hoeveelheid benodigde vitamine D suppletie is afhankelijk van de leeftijd. Kinderen vanaf 4 jaar en volwassenen tot 50 jaar kunnen 100 UI per dag extra gebruiken. Volwassenen van 50 tot 70 jaar kunnen 200 tot 400 UI vitamine D₃ per dag extra gebruiken en ouderen vanaf 70 jaar, 400 tot 600 UI per dag (Gezondheidsraad). Doordat ouderen vaak veel zitten binnen, nemen ze minder UVB straling op. Ook maken ze minder vitamine D aan, waardoor geadviseerd wordt vooral in de winter vitamine D te suppleren, om de kans op botontkalking en botbreuken te verkleinen. Op een relatief gemakkelijke en goedkope manier kunnen verschillende concentraties vitamine D₃ worden ingenomen. Vitamine D₃ is te krijgen in tabletvorm, in druppelvloeistof, als drank, in poedervorm, als bruis- en kauwtablet of in combinatie met calcium. De drempel om vitamine D₃ als supplement in te nemen is daarom laag (Online Drogist). Ook zouden ouderen behandeld kunnen worden met fotherapie, welke in tegenstelling tot zonnebanken uitsluitend UVB straling uitstraalt. In een 8 weken durend onderzoek van Chel *et al.* waar ouderen wekelijks bestraald werden met 0,5 MED UVB straling (Minimale Erythemale Dosis (MED), een maat voor stralingsenergie per cm²), namen de 25(OH)D waarden significant toe (Chel *et al.*, 2011). Wanneer al op jonge leeftijd een verhoogde hoeveelheid vitamine D in wordt genomen, verlaagd dit de kans op het ontstaan van MS. Bij vrouwen

die in hun adolescentie meer dan 400 IU per dag hebben ingenomen, is de kans op het ontstaan van MS, op latere leeftijd, verlaagd.

Discussie

Er wordt verondersteld dat vitamine D een belangrijke factor is in de pathogenese van Multiple Sclerose. Ondanks de bevestigde positieve relatie tussen de vitamine D serum concentratie en het risico op het ontstaan van MS en het verloop van MS, is nog niet exact bekend op welke wijzen vitamine D de pathogenese van MS beïnvloedt. Inleidend is de pathologie en immunologie van MS besproken, evenals de risicofactoren die de kans op het ontwikkelen van MS vergroten. Een tekort aan vitamine D is hier er een van. In deze scriptie is onderzocht op welke manieren vitamine D de cellulaire adaptieve immuun respons die een rol speelt bij de pathologie MS beïnvloedt. De Th1, Th2 en Th17 respons en de activiteit van Treg's worden aangegrepen door vitamine D. Wanneer vitamine D in verschillende concentraties en op verschillende leeftijden wordt toegediend aan controle groepen en MS patiënten, heeft dit effect op de kans van het ontstaan van MS en het verloop van de ziekte.

Uit het onderzoek van Munger *et al.* bleek dat vooral mannen onder de 20 jaar met lage 25(OH)D waarden een verhoogd risico hebben op het ontwikkelen van MS. Ook is gebleken dat wanneer vrouwen in hun adolescentie de inname van vitamine D was verhoogd, ze een verlaagd risico op MS hadden ontwikkeld. Dit zouden aanleidingen kunnen zijn om te stellen dat jonge mensen gevoeliger zijn voor concentratie verschillen van vitamine D. Niet alleen de momentele vitamine D waarden zijn van belang bij de associatie met MS, ook de waarden die in de adolescentie zijn bereikt mogen niet vergeten worden.

Bij de onderzoeken van Kimball en Burton zijn ontzettend hoge concentraties vitamine D₃ gesuppleerd. Een volwassene heeft genoeg aan 1000 UI vitamine D per dag en waarden boven de 10.000 zijn toxisch. Toch hebben Kimball en Burton hun proefpersonen 40.000 UI per dag gegeven, waarbij ze positieve resultaten verkregen. In het onderzoek van Kampman waar lagere concentraties en met lagere frequentie vitamine D, 20.000 UI per week, werden gesuppleerd, was geen relatie te zien tussen vitamine D inname en verminderde progressie van MS, terwijl de concentraties 25(OH)D in het serum net als bij de onderzoeken van Kimball en Burton boven de 100 nmol/liter lag. Waarom Kampman dan toch geen positieve resultaten verkreeg is onduidelijk. Niet zeker is of Kampman calcium heeft gesuppleerd aan zijn proefpersonen, zoals Kimball en Burton hebben gedaan. Vitamine D zorgt voor de mobilisatie en opname van calcium in het lichaam. Bij deze hoge concentraties vitamine D in het serum ontstaat hypercalciurie. Wanneer er geen extra calcium wordt toegediend kan dit leiden tot osteoporose en wellicht kunnen andere immunologische mechanismen ook beïnvloedt worden.

Sloka *et al.* en Daniel *et al.* hebben muizen gebruikt in het onderzoek waarin een auto-immuunziekte tot expressie kwam. Dit hebben ze op verschillende manieren bewerkstelligd. Sloka *et al.* heeft EAE muizen gebruikt, Daniel *et al.* heeft de muizen behandeld met TNBS-colitis. Ook al zijn dit vergelijkbare modellen waarbij een auto-immuunziekte wordt nagebootst, ze komen via een andere route tot stand. Wanneer de immunologie op een andere manier wordt beïnvloed, zal deze waarschijnlijk ook anders reageren op externe factoren. EAE kan actief en adoptief worden geïnduceerd in muizen. Wanneer ze adoptief, door neuroantigen-geactiveerde lymfocyten te plaatsen, geïnduceerd zijn resulteert dit in een ernstigere ziekte dan wanneer ze actief, door het immuniseren met bijvoorbeeld PLP of MBP, geïnduceerd zijn (Miller *et al.*, 2007). Hier moet op gelet worden in vervolgonderzoek. De immunologische mechanismen kunnen anders reageren op vitamine D in adoptief dan wel actief geïnduceerde EAE muizen.

Bij de proeven waarbij het effect van vitamine D op de T- cel respons werd onderzocht, werd de actieve metaboliet $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gebruikt. Dit is nodig, omdat *in vitro* $25(\text{OH})\text{D}$ niet omgezet zal worden tot de actieve metaboliet die onder andere de immunologische respons beïnvloedt. Op die manier komen we te weten welk effect vitamine D *in vivo* heeft op de respons. Echter, er is beschreven dat CYP27B1 gen mutaties en VDR gen polymorfismen Apa1 en Taq1 significant meer voorkomen bij MS patiënten dan controle groepen. Deze genmutaties zorgen er respectievelijk voor dat 1α -hydroxylase $25(\text{OH})\text{D}$ niet kan omzetten in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en dat de transcriptie van genen betrokken bij onder andere de immunologische respons niet meer kan optreden nadat $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de VDR heeft gebonden. De positieve effecten van vitamine D kunnen dus wellicht niet iedereen bereiken. In de toekomst zal onderzoek gedaan moeten worden naar de mutaties die zorgen voor de (dis)functie van 1α -hydroxylase en de VDR en het herstellen hiervan.

De manier waarop de concentratie vitamine D in het serum verhoogd kan worden waardoor het risico op MS verkleind wordt en de progressie van MS af neemt, is vrij makkelijk. Vitamine D kan gesuppleerd worden in de vorm van tabletten, druppels of drankjes. Dit geldt echter alleen voor degenen waarvan de omzetting tot $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en de VDR goed functioneren. Ook via fotherapie kan de aanmaak van vitamine D in de huid worden gestimuleerd. Ook al is de effectiviteit bij ouderen bewezen, toch zal het bij hen de aanmaak in de verouderde huid trager gaan. Dit is te wijten aan de verminderde omzetting van 7-dehydrocholesterol in previtamine D_3 . Hierdoor zullen ze langer bestraald moeten worden met UVB, welke schadelijk voor de huid kan zijn.

In deze scriptie is de invloed van vitamine D op de cellulaire adaptieve respons van MS onderzocht. Vitamine D verlaagt het risico op MS en neemt de progressie van MS af, door aan te grijpen op de verschoven Th1, Th2 en Th17 respons en door de activiteit van Treg's te beïnvloeden. Nog veel mechanismen waarmee vitamine D de pathologie MS beïnvloedt zijn onbekend en tegenstrijdige resultaten worden gevonden in onderzoeken waarbij vitamine D gesuppleerd wordt aan MS patiënten. In de toekomst zal onderzoek gedaan moeten worden naar mutaties die zorgen voor het disfunctioneren van 1α -hydrolase en de VDR en het herstellen hiervan. Verder moet onderzoek gedaan worden naar de dosis- en leeftijdsafhankelijke respons van vitamine D op het risico en de progressie van MS.

Nawoord

Met veel plezier en interesse voor de pathologie MS en achterliggende immunologische processen heb ik gewerkt aan deze scriptie waarmee ik mijn bachelor biomedische wetenschappen afrond. Het is spijtig maar begrijpelijk dat de volledige mechanismen van MS en het effect van vitamine D hierop nog niet bekend zijn. Vervolgonderzoek zal dan ook interessante en veelbelovende resultaten opleveren. Ik wil graag mijn begeleider Peter Heeringa bedanken voor zijn hulp bij het sturen van mijn scriptie in de goede richting en verdere begeleiding.

Referenties

- Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. 'Cellular and Molecular Immunology'. Saunders Elsevier. 2010. 6e editie, pp. 419-439.
- Afzali B., Lombardi G., Lechler R.I., Lord G.M. 'The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease'. *Clinical and Experimental Immunology*. 2007. Vol. 148, pp. 32-46
- Alcina A., Abad-Grau Mdel M., Fedetz M. 'Multiple Sclerosis risk variant HLA-DRB1*1501 associates with high expression of DRB1 gene in different human populations'. *Plos One*. 2012. Vol. 7.
- Alonso A., Jick S.S., Okek M.J. 'Recent use of oral contraceptives and the risk of multiple sclerosis'. *Archives of neurology*. 2005. Vol. 62, pp. 1362-1365.
- Ascherio A., (2) Munger K.L., Simon K.C. 'Vitamin D and multiple sclerosis'. *Lancet Neurology*. 2010. Vol. 9, pp. 599-612.
- Ascherio A., Munger K.L. 'Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection'. *Annals of neurology*. 2007. Vol. 61, pp. 288-299.
- Ascherio A., (1) Munger K.L., Simon K.C. 'Vitamin D and multiple sclerosis'. *Lancet Neurology*. 2010. Vol. 8, pp. 599-612.
- Barnes P.J. 'Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease'. *Nature Reviews Immunology*. 2008. Vol. 8, pp.183-192.
- Beyeen AD., Adzemovic MZ., Ockinger J. 'IL-22RA2 associates with multiple sclerosis and macrophage effector mechanisms in experimental neuroinflammation'. *Journal of Immunology*. 2010. Vol. 185, pp. 6883-6890.
- Bjartmar C., Yin X., Trapp BD. 'Axonal pathology in myelin disorders.' *Journal of Neurocytology*. 1999. Vol. 28, pp. 383-395.
- Brown E.M., Gamba G., Riccardi R. 'Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid'. *Nature*. 1993. Vol. 366, pp. 575-580.
- Burton J.M., Kimball S., Vieth R. 'A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis'. *Neurology*. 2010. Vol. 74, pp.1852-1859.
- Campbell D.J., Koch M.A. 'Phenotypic and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells'. *Nature Reviews Immunology*. 2011. Vol. 11, pp. 119-130.
- Carpentier PA., Smit W., Olsen JK. 'Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli'. *Glia*. 2005. Vol. 49, pp. 360-374
- Chambers T.J., Magnus C.J. 'Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts.' *Journal of Pathology*. 1982. Vol. 136, pp. 27-39.
- Chang J., Cha H., Lee D. '1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Inhibits the Differentiation and Migration of T_H17 Cells to Protect against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis'. *Plos One*. 2010. Vol. 5.
- Chao M.J., Barnardo M.C., Lincoln M.R. 'HLA class I alleles tag HLA-DRB1*1501 haplotypes for differential risk in multiple sclerosis susceptibility.' *Proceedings of the National Academy of Science*. 2008. Vol. 105, pp. 13069-13074.
- Chel V.G., Ooms M.E., Pavel S. 'Prevention and treatment of vitamin D deficiency in Dutch psychogeriatric nursing home residents by weekly half-body UVB exposure after showering: a pilot study'. *Age and Aging*. 2011. Vol. 40, pp. 211-214.
- Christensen T. 'Human herpesviruses in MS'. *International MS journal*. 2007. Vol. 14, pp. 41-47.
- Correale J., Ysraelit M.C., Gaitan M.I. 'Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis'. *Brain*. 2009. Vol. 132, pp. 1146-1160.
- Correale J., Ysraelit M.C., Gaitan M.I. 'Vitamin D- mediated immune regulation in multiple sclerosis'. *Journal of Neurological Sciences*. 2011. Vol. 311, pp. 23-31.
- Cree BAC. 'Multiple sclerosis. Current Diagnosis and Treatment in Neurology'. Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical. 2007

- Daniel C., Sartory N.A., Zahn N. 'Immune Modulatory Treatment of Trinitrobenzene Sulfonic Acid Colitis with Calcitriol Is Associated with a Change of a T Helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and Regulatory T Cell Profile'. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2008. Vol. 324, pp. 23-33.
- Dawson-Hughes B. *et al.*, 'Estimates of optimal vitamin D status'. *Osteoporosis International*. 2005. Vol. 16, pp. 713-716.
- De Jager P.L., Jia X., Wang J. 'Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci'. *Nature Genetics*. 2009. Vol. 41, pp. 776-782.
- De online Drogist.nl, 'http://www.deonlinedrogist.nl/vitamine-vitamine-c-964_983_1243_1247.html' Geraadpleegd op 26 juni 2012.
- DeLuca H.F. 'Overview of general physiologic features and functions of vitamin D_{1,2,3,4}'. *American Society for Clinical Nutrition*. 2004. Vol. 80, pp. 1689-1696.
- Dhib-Jalbut S., Arnolda D. L., Clevelanda D. W. 'Neurodegeneration and neuroprotection in multiple sclerosis and other neurodegenerative diseases'. *Journal of neuroimmunology*. 2006, Vol. 176, pp. 198-215.
- Dyment D.A., Ebers G.C., Sadovnick A.D. 'Genetics of multiple sclerosis'. *Lancet neurology*. 2004. Vol. 3, pp. 104-110.
- Ebers G.C. 'Environmental factors and multiple sclerosis'. *Lancet Neurology*. 2008. Vol. 7, pp. 268-277.
- Ebers GC. 'Editorial regarding "Explaining multiple sclerosis prevalence by ultraviolet exposure: a geospatial analysis" by Beretich and Beretich'. *Multiple Sclerosis*. 2009. Vol. 15, pp. 889-890.
- Garabedian M., Holick M.F., DeLuca H.F. 'Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by the parathyroid glands'. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1972. Vol. 69, pp. 1673-1676.
- Gezondheidsraad. 'Voedingsnormen: calcium, vitamine D, thiamine, riboflavine, niacine, pantotheenzuur en biotine'. Den Haag. 2000.
- Glass C. K., Saijo K., Winner B. 'Mechanisms underlying Inflammation in Neurodegeneration'. *Cell*. 2010. Vol. 140, pp. 918-934 n
- Goverman J.M. 'Immune Tolerance in Multiple Sclerosis'. *Immunological Reviews*. 2011. Vol. 241, pp. 228-240.
- Groot de A.C., Toonstra J. 'Kanker en huid- Risicofactoren'. 2010.
- Guillot X., Semerano L., Saidenberg-Kermanach S. 'Vitamin D and inflammation'. *France Service de rhumatologie*. 2010. wel
- Hanisch UK. 'Microglia as a source and target of cytokines'. *Cell Biology of Microglia*. 2002. Vol. 40, pp. 140-155.
- Hauser S.L., Goodwin D.S. 'Multiple sclerosis and other demyelinating diseases'. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 2008. Vol. 17 pp. 1-20.
- Haussler M.R., Haussler C.A., Bartik L. 'Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention'. *Nutrition Reviews*. 2008. Vol. 66, pp. 98-112.
- Het grote medische Handboek. Rebo Publishers. 2009, pp.387-391, 620-621
- Hewison M., Zehnder D., Bland R. '1alpha-Hydroxylase and the action of vitamin D.' *Journal of molecular endocrinology*. 2000. Vol. 25, pp. 141-148.
- Holick M.F. 'Vitamin D and health: evolution, biologic functions, and recommended dietary intakes for vitamin D'. *Nutrition and Health*. 2010. Pp. 3-33.
- Jeffery L.E., Burke F., Mura M. '1,25-dihydroxyvitamin D₃ and interleukin-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3'. *Journal of Immunology*. 2009. Vol. 183, pp. 5458-5467
- Jing H., Milo R., Swoweland P. 'Inteferon beta-1b reduces interferon gamma-induced antigen presenting capacity of human glial and B cells'. *Journal of Neuroimmunology*. 1995. Vol. 61, pp. 17-22.
- Jones J.L., Phuah C.L., Cox A.L. 'IL-21 drives secondary autoimmunity in patients with multiple sclerosis, following therapeutic lymphocyte depletion with alemtuzumab (Campath-1H)'. *Journal of Clinical Investigation*. 2009. Vol. 119, pp. 2052-2061

- Kampman M.T., Steffensen L.H., Mellgren S.I. 'Effect of vitamin D3 supplementation on relapses, disease progression and measures of function in persons with multiple sclerosis: exploratory outcomes from a double-blind randomised controlled trial'. *Multiple Sclerosis*. 2012.
- Kantarci O., Wingerchuk D. 'Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights'. *Current opinion in Neurology*. 2006. Vol. 19, pp. 248-254.
- Kimball S., Vieth R., Dosch H.M. 'Cholecalciferol plus calcium suppresses abnormal PBMC reactivity in patients with multiple sclerosis'. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011. Vol. 96, pp. 2826-2834.
- Kohler R.E., Caon A.C., Willenborg D.O. 'A Role for Macrophage Inflammatory Protein-3 α /CC Chemokine Ligand 20 in Immune Priming During T Cell-Mediated Inflammation of the Central Nervous System'. *Journal of Immunology*. 2003. Vol. 170.
- Korn T. 'Pathophysiology of multiple sclerosis'. *Journal of Neurology*. 2008. Vol. 6, pp. 2-6.
- Kragt J., Amerongen van B., Killestein J. Higher levels of 25-hydroxyvitamin D are associated with a lower incidence of multiple sclerosis only in women. *Multiple Sclerosis*. 2009. Vol. 15, pp. 9-15.
- Laman J. D. Hintzen R. Q. en 't Hart B. A. 'Nieuwe ontwikkelingen in de Medische Immunologie' Afd. Immunologie Erasmus MC. 2010, Hfst 7, pp. 96-100.
- Levine J.A., *et al.*, 'The indoor UV tanning industry: a review of skin cancer risk, health benefit claims, and regulation'. *Journal of American Academy of Dermatology*. 2005. Vol. 53, pp. 1038-1044.
- Lincoln M.R., Ramagopalan S.V., Chao M.J. 'Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility'. *Proceedings of the National Academy of Science*. 2009. Vol. 106, pp. 7542-7547.
- Lull M.E., Block M.L. 'Microglial Activation & Chronic Neurodegeneration'. *Neurotherapeutics*. 2010. Vol. 7, pp. 354-365.
- Mahon B.D., Gordon S.A., Cruz J. 'Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation'. *Journal of Neuroimmunology*. 2003. Vol. 134, pp. 128-132.
- Markovic-Plese S., Cortese I., Wandinger KP. 'CD4⁺CD28⁻ costimulation-independent T cells in multiple sclerosis'. *Journal of Clinical Investigation*. 2001. Vol. 108, pp. 1185-1194.
- Matusevicius D., Kivisakk P., He B., Kostulas N., Ozenci V., Fredrikson S., Link H. 'Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis'. *Multiple Sclerosis*. 1999. Vol. 5, pp. 101-104.
- Miller S.D., Karpus W.J., Davidson T.S. 'Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse'. *Current Protocols in immunology*. 2007. Chapter 15.
- Miller S.D., Turley D.M., Podajil J.R. 'Antigen-specific tolerance strategies for the prevention and treatment of autoimmune disease'. *Nature Reviews. Immunology*. 2007. Vol 7, pp. 665-677.
- Monteleone I., Pallone F., Monteleone G. 'Th17-related cytokines: new players in the control of chronic intestinal inflammation'. *BMC Medicine*. 2011. Vol. 9, pp. 122.
- Munger K.L., Levin L.I., Hollis B.W. 'Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis'. *JAMA*. 2006. Vol. 296, pp. 2832-2838.
- Muskiet F.A. *et al.*, 'Vitamine D: waar liggen de grenzen van deficiëntie, adequate status en toxiciteit?' *Nederlands tijdschrift voor klinische chemie en labgeneeskunde*. 2007. Vol. 32, pp. 150-158.
- Oksenberg J.R., Barcellos L.F., Cree B.A. 'Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans'. *American Journal of human genetics*. 2004. Vol. 74, pp. 160-167.
- Opal S.M., DePalo V.A. 'Anti-inflammatory cytokines'. *Chest*. 2000. Vol. 117, pp. 1162-1172.
- Ozenci V., Kouwenhoven M., Teleshova N. 'Multiple sclerosis: pro- and anti-inflammatory cytokines and metalloproteinases are affected differentially by treatment with IFN β '. *Journal of Neuroimmunology*. 2000. Vol. 108, pp. 236-243.
- Perrin P.J., Lovett-Racke A., Phillips S.M. 'Differential requirements of naïve and memory T cells for CD28 costimulation in autoimmune pathogenesis'. *Histology and histopathology*. 1999. Vol 14, pp. 1269-1276.

- Racke M.K., Ratts R.B., Arredondo L. 'The role of costimulation in autoimmune demyelination'. *Journal of neuroimmunology*. 2000. Vol. 107, pp. 205-215.
- Ramagopalan S.V., Dymnt D.A., Ebers G.C. 'Genetic epidemiology: the use of old and new tools for multiple sclerosis'. *Trends in Neurosciences*. 2008. Vol. 31, pp. 545-652.
- Ramagopalan SV., Maugeri NJ., Handunnetthi LH. 'Expression of the Multiple Sclerosis-Associated MHC Class II Allele *HLA-DRB1*1501* Is Regulated by Vitamin D'. *Plos Genetics*. 2009.
- Reboldi A., Coisne C., Baumjohann D. 'C-C chemokine receptor 6-regulated entry of Th-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE'. *Nature Immunology*. 2009. Vol. 10, pp. 514-523.
- Runia T.F., Hop W.C., Rijke de Y.B. 'Lower serum vitamin D levels are associated with a higher relapse risk in multiple sclerosis'. *Neurology*. 2012.
- Shahbazi M., Ebadi H., Fathi D. '*HLA-DRB1*1501* intensifies the impact of IL-6 promoter polymorphism on the susceptibility to multiple sclerosis in an Iranian population' *Multiple Sclerosis Journal*. 2010. Vol. 16, pp. 1173-1177.
- Siffrin V., Brandt AU, Herz J., Zipp F. 'New insights into adaptive immunity in chronic neuroinflammation'. *Advances in Immunology* 2007. Vol. 96, pp. 1-40.
- Simon K.C., Munger K.L., Ascherio A. Vitamine D and multiple sclerosis: epidemiology, immunology and genetics. *Current opinion in neurology*. 2012. Vol. 25, pp. 246-251.
- Sloka S., Silva C., Wang J. 'Predominance of Th2 polarization by Vitamin D through a STAT6-dependent mechanism'. *Journal of Neuroinflammation*. 2011. Vol. 8.
- Smolders J. (1) 'Safety and T Cell Modulating Effects of High Dose Vitamin D₃ Supplementation in Multiple Sclerosis'. 2010. *Plos Hub for Clinical Trials*.
- Smolders J., Damoiseaux J., Menheere P. 'Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review'. *Journal of Neuroimmunology*. 2008. Vol. 194, pp. 7-17.
- Smolders J.,(2) Menheere P., Thewissen M. 'T cell function correlates with serum 25-hydroxyvitamin D, but not with 1,25-dihydroxyvitamin D, parathyroid hormone and calcium levels in patients with relapsing remitting multiple sclerosis'. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2010. Vol. 121, pp. 243-246.
- Stachowiak J. 'Is Avonex Right for You?' *Medical Review Board*. 2008
- Stewart N., Simpson S., Mei van der I. 'Interferon-β and serum 25-hydroxyvitamin D interact to modulate relapse risk in MS'. *Neurology*. 2012.
- 'Stichting MS research' <http://www.msresearch.nl/ziekte-proces>. Geraadpleegd op 15 juni 2012
- Suda T., Ueno Y., Fujii K. 'Vitamin D and bone'. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003. Vol. 88, pp. 259-266.
- Sundström P. Nyström L. Hallmans G. 'Smoke exposure increases the risk for multiple sclerosis'. *European Journal of neurology*. 2008. Vol. 15, pp. 579-583.
- Tajouri L., Ovaric M., Curtain R. 'Variation in the vitamin D receptor gene is associated with multiple sclerosis in an Australian population'. *Journal of Neurogenetics*. 2005. Vol. 19, pp. 25-38.
- Thacher T.D., Clarke B.L. 'Vitamin D Insufficiency' *Myo Clinic Proceedings*. 2011. Vol. 86, pp. 50-60.
- Vanderlugt CL., Begolka WS., Neville KL. 'The functional significance of epitope spreading and its regulation by co-stimulatory molecules'. *Immunological Reviews*. 1998. Vol. 164, pp. 63-72.
- Vieth R. 'Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety'. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1999. Vol. 69, pp. 842-856.
- Wei L., Laurence A., Elias KM. 'IL-21 IS PRODUCED BY TH17 CELLS AND DRIVES IL-17 PRODUCTION IN A STAT3-DEPENDENT MANNER'. *Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282, pp. 34605-34610

Yamamoto M., Kawanobe Y., Takahashi H. 'Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat.' *Journal of Clinical Investigation*. 1984. Vol. 74, pp.507-513.

Zhang X., Markovic-Plese S. 'Interferon beta inhibits the Th17 cell-mediated autoimmune response in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis'. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2010. Vol. 112, pp. 641-645.

Zheng Y., Danilenko D.M., Valdez P., Kasman I., Eastham-Anderson J., Wu J., Ouyang W. 'Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis'. *Nature*. 2007. Vol. 445, pp. 648-651.

Zuvich R.L., McCauley J.L., Pericak-Vance M.A. 'Genetics and pathogenesis of multiplesclerosis'. *Elsevier Seminars in Immunology*. 2009. Vol. 21, pp. 328-333.