

Autoprzeciwciała przeciwko kalcytriolowi w toczeniu rumieniowatym układowym – doniesienie wstępne

Autoantibodies against calcitriol in systemic lupus erythematosus – preliminary report

Jarosław Bogaczewicz¹, Anna Sysa-Jędrzejowska¹, Jakub Ząbek², Ewa Kontny³, Anna Woźniacka¹

¹Katedra i Klinika Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Anna Sysa-Jędrzejowska

²Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologicznego im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. n. biol. Jakub Ząbek

³Zakład Patofizjologii Instytutu Reumatologicznego im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. n. biol. Włodzimierz Maśliński

Przegl Dermatol 2010, 97, 171–175

STRESZCZENIE

SŁOWA KLUCZOWE:

toczeń rumieniowaty układowy, witamina D, kalcytriol, kalcydiol, autoprzeciwciała.

KEY WORDS:

systemic lupus erythematosus, vitamin D, calcitriol, calcidiol, autoantibodies.

Wprowadzenie. U chorych na toczeń rumieniowaty układowy (ang. *systemic lupus erythematosus* – SLE) często stwierdza się niedobór witaminy D. Spośród możliwych przyczyn tego stanu rozpatruje się: objęcie procesem chorobowym nerek, terapię z zastosowaniem kortykosteroidów lub leków przeciwmalarycznych, a także fotoprotekcję. Dotychczas nie w pełni poznany jest wpływ autoprzeciwciał skierowanych przeciwko kalcytriolowi na stężenie kalcydiolu w surowicy.

Cel pracy. Ocena częstości występowania autoprzeciwciał skierowanych przeciwko kalcytriolowi w grupie chorych na SLE.

Materiał i metodyka. Badaniem objęto grupę 37 chorych na SLE. Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych dawców krwi. Przeciwciała oznaczano metodą immunoenzymatyczną.

Wyniki. Autoprzeciwciała skierowane przeciwko kalcytriolowi wykryto u 3 pacjentów (8,1%) z SLE. Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w stężeniu kalcydiolu [25(OH)D₃] między chorymi, u których obecne były przeciwciała skierowane przeciwko kalcytriolowi, a osobami bez tych przeciwciał.

Wnioski. W surowicy chorych na SLE obserwuje się autoprzeciwciała przeciwko kalcytriolowi, jednak ich obecność wydaje się nie wpływać na występowanie niedoboru witaminy D.

ABSTRACT

Introduction. In patients with systemic lupus erythematosus (SLE) vitamin D deficiency is a frequent problem. Renal insufficiency, treatment with corticosteroids or antimalarials and photoprotection are regarded as the main causes of vitamin D deficiency. To date the role of antibodies directed against calcitriol in this process is not completely elucidated.

Objective. To determine the frequency of occurrence of antibodies against calcitriol in patients with SLE.

Material and methods. The study covered 37 patients with SLE and sera obtained from 30 healthy blood donors as a control. In the determination of autoantibodies against calcitriol, an immunoenzyme assay was used.

ADRES DO KORESPONDENCJI:

dr n. med.

Jarosław Bogaczewicz

Klinika Dermatologii

i Wenerologii

Uniwersytet Medyczny

ul. Krzemieniecka 5

94-017 Łódź

e-mail: jaroslaw.bogaczewicz@umed.lodz.pl

Results. Autoantibodies directed against calcitriol were found in 3 (8.1%) patients with SLE. The study did not reveal a significant difference in the concentration of calcidiol ($25(\text{OH})\text{D}_3$) between SLE patients with and without autoantibodies directed against calcitriol.

Conclusions. Autoantibodies against calcitriol do exist in SLE patients, but they do not influence the calcidiol level.

WPROWADZENIE

W przebiegu toczenia rumieniowatego układowego (ang. *systemic lupus erythematosus* – SLE) u znacznego odsetka chorych stwierdza się niedobór witaminy D. W badaniach własnych wykazano, że stan niedostatecznego zaopatrzenia w witaminę D, o różnym stopniu nasilenia, dotyczył ponad 90% pacjentów, szczególnie w miesiącach zimowych [1]. Dane te w zestawieniu z istnieniem zwiększonego ryzyka rozwoju osteoporozy u chorych na SLE skłaniają z jednej strony do opracowania zaleceń wczesnego postępowania diagnostycznego oraz profilaktyczno-terapeutycznego, natomiast z drugiej do poszukiwania przyczyn tego zaburzenia [2]. Wskazuje się, że jedną z głównych przyczyn niedoboru witaminy D u pacjentów z SLE jest zmniejszona ekspozycja na promieniowanie słoneczne, w tym stosowanie fotoprotekcji [1, 3]. W analizie przyczyn niedoboru witaminy D i jej następstw metabolicznych nie sposób pominąć zagadnienia nieprawidłowości w humoralnych mechanizmach odpornościowych stwierdzanych w przebiegu choroby. Wyrazem tych zaburzeń jest występowanie autoprzeciwciał skierowanych przeciwko własnym antygenom. Dotychczas w tej grupie chorych udokumentowano występowanie 116 autoprzeciwciał o różnej swoistości [4]. Słuszne wydaje się więc wysunięcie hipotezy, że jednym z powodów niedoboru witaminy D może być synteza autoprzeciwciał skierowanych przeciwko witaminie D lub jej metabolitom.

CEL PRACY

Ocena częstości występowania przeciwciał skierowanych przeciwko aktywnemu metabolitowi witaminy D – kalcytriolowi – w grupie chorych na SLE.

MATERIAŁ I METODYKA

Badaniem objęto grupę 37 chorych na postać układową toczenia rumieniowatego – 31 kobiet i 6 mężczyzn – w wieku od 25 do 71 lat, średnia wieku $49,68 \pm 11,22$ roku, leczonych w Klinice Dermato-

logii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego oraz Centrum Diagnostyczno-Leczniczym Chorób Skóry w Łodzi. Grupę kontrolną stanowiło 30 surowic zdrowych dawców krwi. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę lokalnej Komisji Etycznej (Nr RNN/67/08/KE).

Wszyscy pacjenci byli poddani szczegółowemu badaniu podmiotowemu i przedmiotowemu. Rozpoznanie SLE ustalano na podstawie spełnienia co najmniej 4 z 11 kryteriów Amerykańskiego Towarzystwa Reumatologicznego (ang. *American College of Rheumatology*) z 1997 roku [5].

W oznaczeniu autoprzeciwciał skierowanych przeciwko kalcytriolowi [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] zastosowano metodę immunoenzymatyczną (ang. *enzyme linked immunosorbent assay* – ELISA) według Carvalho i wsp. z pewnymi modyfikacjami [6]. W metodzie tej wykorzystano zdolność kalcytriolu (Instytut Farmaceutyczny, Polska) do adsorpcji na fazie stałej (płytkę titracyjnej). Do każdego „basenika” płaskodennej, 96-basenikowej płytki titracyjnej (Maxisorp, Nunc, Dania) dodano roztwór o stężeniu $5 \mu\text{g}$ kalcytriolu na 1 ml 70-procentowego roztworu etanolu. Płytkę inkubowano 24 godziny w temperaturze 4°C . Po odparowaniu płytki z alkoholowego roztworu kalcytriolu do baseników płytki, w celu jej zablokowania, dodano roztwór albuminy bydlęcej (BSA) w buforowanym fizjologicznym roztworze soli o pH 7,2 (PBS) i inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C . Płytkę opróżniono z roztworu blokującego i wypłukano trzykrotnie roztworem PBS. Następnie do baseników dodano surowice pacjentów w rozcieńczeniu 1 : 100 w BSA i PBS, po czym inkubowano przez 4 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji z surowicami płytki ponownie trzykrotnie płukano roztworem PBS, do każdego basenika dodano po $50 \mu\text{l}$ koniugatu – frakcji IgG surowicy antyglobulinowej koniugowanej z peroksydazą chrzaniową (DAKO, Dania) i inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C . Inkubację z koniugatem zakończono trzykrotnym wypłukaniem płytki roztworem PBS, po czym do baseników dodano mieszanek substratową dla peroksydazy. Wartość absorbancji odczytywano przy długości fali wyno-

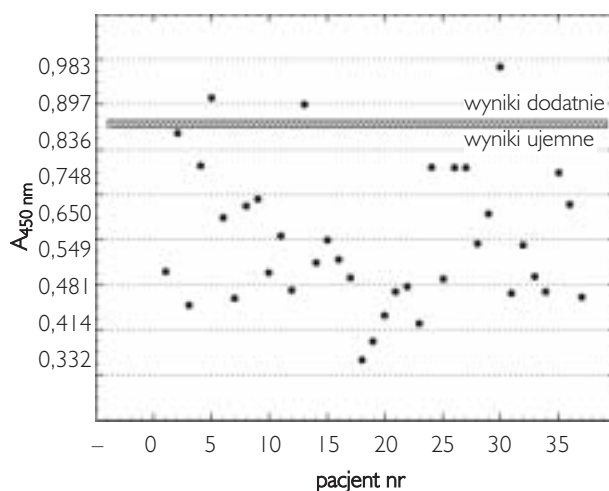
szącej 450 nm na automatycznym czytniku do płytek ELISA. Surowice chorych badano trzykrotnie. Za wynik dodatni przyjęto wartość gęstości optycznej wynoszącą powyżej średniej i trzech odchyłek standardowych uzyskanej dla grupy 30 zdrowych dawców krwi.

Oznaczenie niedoboru witaminy D oparto na analizie stężenia w surowicy jej głównego krążącego metabolitu – kalcydiolu [25(OH)D₃] – przy użyciu odczynników kalibracyjnych i surowic kontrolnych, zgodnie z zaleceniami producenta (numer katalogowy: 11706802001, 11706799001, 11776576322, 10394246001, 03314847190, Roche Diagnostic, Mannheim GmbH), przeprowadzonej zautomatyzowaną metodą elektrochemiluminescencji na automatycznej platformie Elecsys 2010 (Roche Diagnostic, Mannheim GmbH) w systemie kontroli DEQAS (ang. *vitamin D external quality assessment scheme*) [7]. Zmienność wewnątrzoznaczeniowa i międzyoznaczeniowa wynosiła poniżej 15%.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem oprogramowania Statistica v.6.1. Do oceny istotności różnic w stężeniu kalcydiolu między dwoma grupami zastosowano test U Manna-Whitneya. Analizę zależności między obecnością przeciwciał skierowanych przeciwko 1,25(OH)₂D₃ w surowicy chorych na SLE a badanymi parametrami klinicznymi oceniono dokładnym testem Fishera.

WYNIKI

Autoprzeciwciała skierowane przeciwko kalcytriolowi wykazano u 3 pacjentów (8,1%) z SLE (ryc. 1.). Deficyt witaminy D [25(OH)D₃ < 10 ng/ml] stwierdzono u 16 (43,24%), niedobór (10–20 ng/ml) u 13 (35,13%), a hipowitaminozę (20–30 ng/ml) u 6 pacjentów (16,21%). Wartości mieszczące się w zakresie zalecanym (30–80 ng/ml) zaobserwowano u 2 chorych (5,04%).



Ryc. 1. Wynik pomiaru absorbancji ($A_{450\text{ nm}}$) w metodzie immunoenzymatycznej oznaczania autoprzeciwciał przeciwko kalcytriolowi u chorych na SLE

Fig. 1. Results of absorbance ($A_{450\text{ nm}}$) in immunoassay technique in measurement of autoantibodies directed against calcitriol in patients with systemic lupus erythematosus

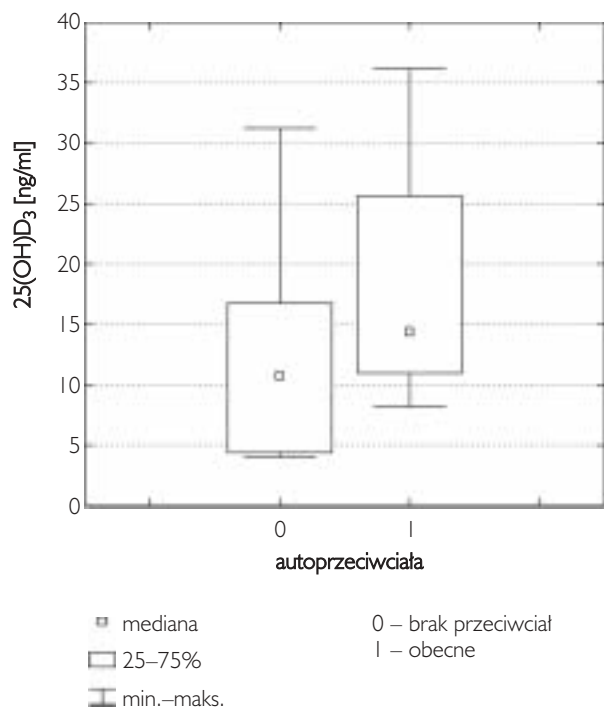
dzono u 16 (43,24%), niedobór (10–20 ng/ml) u 13 (35,13%), a hipowitaminozę (20–30 ng/ml) u 6 pacjentów (16,21%). Wartości mieszczące się w zakresie zalecanym (30–80 ng/ml) zaobserwowano u 2 chorych (5,04%).

Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu 25(OH)D₃ między chorymi na toczeń, u których obecne były przeciwciała skierowane przeciwko kalcytriolowi, a osobami bez tych przeciwciał (ryc. 2.).

OMÓWIENIE

W przebiegu SLE natężenie procesów autoimmunizacyjnych jest duże, zwłaszcza w aktywnych okresach choroby. Szczególnie istotne znaczenie mają przeciwciała skierowane przeciwko składnikom białkowym i niebiałkowym jądra komórkowego oraz antygenom białkowym występującym w cytoplazmie, organellach komórkowych lub błonie komórkowej, a zaangażowanym w procesy zainicjowane w jądrze komórkowym [8].

W pracy dokonano wstępnej oceny występowania autoprzeciwciał skierowanych przeciwko kalcytriolowi, aktywnemu metabolitowi witaminy D, który jest pochodną dehydrocholesterolu [9, 10].



Ryc. 2. Brak istotnej statystycznie różnicy w stężeniu kalcydiolu [25(OH)D₃] między chorymi na toczeń, u których obecne były przeciwciała skierowane przeciwko kalcytriolowi, a pacjentami bez tych przeciwciał

Fig. 2. No significant difference was found in the concentration of calcidiol (25(OH)D₃) between SLE patients with and without autoantibodies directed against calcitriol

Wykazanie u chorych na SLE autoprzeciwciał skierowanych przeciwko kalcytriolowi tłumaczyłoby, przynajmniej częściowo, upośledzoną aktywność biologiczną witaminy D i mogłoby wskazywać na rolę kolejnego autoantygeny w przebiegu choroby [6]. W badaniach własnych, w celu wykazania autoprzeciwciał skierowanych przeciwko kalcytriolowi, posłużono się testem opartym na technice immunoenzymatycznej, zaproponowanej przez Carvalho i wsp. w 2007 roku [6]. W technice tej zasadniczym narzędziem wykrywania przeciwciał o określonej swoistości są odpornościowe przeciwciała antyimmunoglobulinowe sprzężone z różnymi znacznikami o charakterze enzymu (tzw. koniugaty) [11]. Badane autoprzeciwciała obecne w analizowanych surowicach reagowały z antygenem (kalcytriolem) zaadsorbowanym na fazie stałej. Była nią 96-dółkowa płaskodenna płytka wykonana z syntetycznych polimerów. Siła wiązania antygeny do płytki jest wypadkową liczby ugrupowań chemicznych na fazie stałej i w cząsteczce antygeny, mogących wytwarzać wzajemne wiązania [8]. Są to z reguły oddziaływania słabe typu jonowego, hydrofobowego, wodorowego czy też van der Waalsa [11].

Kalcytriol jest molekułą o małej masie cząsteczkowej, dlatego też pojawia się trudność w jego adsorpcji. Nie ustalono ponadto konfiguracji, w jakiej przylega się do płytki. Nie wiadomo, w jakim stopniu przylega on strukturą pierścieniową, a w jakim ogonem hydroksylowym. Dotychczas opublikowano tylko jedno badanie oceniające częstość występowania przeciwciał skierowanych przeciwko kalcytriolowi u chorych na SLE, w którym wykorzystano metodę immunoenzymatyczną [6]. Carvalho i wsp. stwierdzili przeciwciała w klasie IgG skierowane przeciwko kalcytriolowi u 7 chorych (4%). Autorzy nie wykazali ich związku z obecnością zmian zapalnych stawów, zapaleniem błon surowiczych, zajęciem nerek lub ośrodkowego układu nerwowego, zmian hematologicznych, aktywnością procesu chorobowego ocenianą w skali SLEDAI czy występowaniem przeciwciał przeciwko dsDNA, Sm, SS-A, SS-B, przeciwciał przeciwkardiolipinowych w klasach IgG, IgM, IgA i przeciwko β 2-glikoproteinie I w klasach IgG, IgM i IgA. W cytowanej pracy stwierdzono jednak, że u chorych ze stwierdzonymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ miana przeciwciał przeciwko dsDNA były istotnie wyższe niż w grupie pacjentów bez tych przeciwciał [6].

W pracy Carvalho i wsp. autoprzeciwciała skierowane przeciwko kalcytriolowi należały do klasy IgG [6]. Ograniczeniem badań własnych w oznaczaniu przeciwciał przeciwko kalcytriolowi było wykorzystanie poliwalentnej frakcji surowicy antyglobulinowej koniugowanej z peroksydazą chrzanową. W związku z tym niemożliwe było rozróżnienie kla-

sy przeciwciał przeciwko kalcytriolowi. Niezależnie jednak od stwierdzanej klasy przeciwciał, dotychczas nie poznano roli ich występowania w metabolizmie witaminy D. Nie jest wyjaśnione, czy autoprzeciwciała wpływają na wyniki uzyskiwane w standardowych metodach pomiaru stężeń metabolitów witaminy D. W dalszym ciągu pozostaje do rozstrzygnięcia kwestia, czy mogą one dodatkowo zaburzać aktywność biologiczną witaminy D. Zagadnieniem otwartym jest, czy w warunkach *in vivo* przeciwciała przeciwko kalcytriolowi wiążą się w krążeniu z kompleksem kalcytriol-białko wiążące witaminę D, ponadto jaki to może wywoływać skutek na uwalnianie kalcytriolu w tkankach docelowych, a także jaki mają one związek z innymi autoprzeciwciałami wykrywanymi w chorobach tkanki łącznej [12]. Wyłania się więc potrzeba dalszych badań tego zjawiska i uzyskania pełniejszego obrazu roli przeciwciał przeciwko metabolitom witaminy D w SLE.

WNIOSKI

W surowicy chorych na SLE stwierdza się autoprzeciwciała skierowane przeciwko kalcytriolowi, których obecność wydaje się nie mieć wpływu na występowanie u nich niedoboru witaminy D.

Praca finansowana z funduszy pracy statutowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 503-1019-1.

Piśmiennictwo

1. Bogaczewicz J., Sysa-Jędrzejowska A., Arkuszewska C., Hawro T., Karczmarewicz E., Lorenc R.S. i inni: Czy choroby na toczeń rumieniowaty wymagają suplementacji witaminą D – doniesienie wstępne. *Przeegl Dermatol* 2008, 95, 365-369.
2. Bogaczewicz J., Woźniacka A., Sysa-Jędrzejowska A.: Zastosowanie witaminy D, jej metabolitów i analogów w leczeniu dermatologicznym. *Przeegl Dermatol* 2009, 96, 419-427.
3. Bogaczewicz J., Sysa-Jędrzejowska A., Arkuszewska C., Hawro T., Karczmarewicz E., Lorenc R.S. i inni: Niedobór witaminy D u chorych na toczeń rumieniowaty układowy. *Dermatol Klin* 2008, 10, 129-134.
4. Sherer Y., Gorstein A., Fritzler M.J., Shoenfeld Y.: Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum* 2004, 34, 501-537.
5. Hochberg M.C.: Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997, 40, 1725.
6. Carvalho J.F., Blank M., Kiss E., Tarr T., Amital H., Shoenfeld Y.: Anti-vitamin D, vitamin D in SLE: preliminary results. *Ann N Y Acad Sci* 2007, 1109, 550-557.
7. Carter G.D., Carter R., Jones J., Berry J.: How accurate are assays for 25-hydroxyvitamin D? Data from the international vitamin D external quality assessment scheme. *Clin Chem* 2004, 50, 2195-2197.

8. **Ząbek J.:** Metody wykrywania autoprzeciwciał „markerowych” w chorobach z autoimmunizacją. [w]: Immunologia kliniczna. M.L. Kowalski (red.). Mediton, Łódź, 2000, 787-806.
9. **Woźniacka A., Bogaczewicz J., Sysa-Jędrzejowska A.:** Drugie oblicze słońca – prawdziwy „D”ylemat. Cz. 1. *Przeł Dermatol* 2008, 95, 467-474.
10. **Woźniacka A., Bogaczewicz J., Sysa-Jędrzejowska A.:** Drugie oblicze słońca – prawdziwy „D”ylemat. Cz. 2. *Przeł Dermatol* 2009, 96, 37-44.
11. **Ząbek J.:** Wykrywanie autoprzeciwciał występujących w surowicach chorych na układowe choroby tkanki łącznej metodą ELISA. [w]: Metody diagnostyki serologicznej w reumatologii. S. Luft (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1996, 96-100.
12. **Ząbek J.:** Podstawowe zasady racjonalnej serodiagnostyki autoprzeciwciał markerowych w układowych chorobach tkanki łącznej. *Reumatologia* 2005, 43, 335-340.

Otrzymano: 21 II 2010 r.

Zaakceptowano: 1 III 2010 r.