

# IMMUNOLOGISCHE EFFECTEN VAN VITAMINE D

An-Sofie Vanherwegen, Chantal Mathieu en Conny Gysemans

Klinische en Experimentele Endocrinologie (CEE), KU Leuven

Het immuunsysteem is een complex netwerk dat enerzijds essentieel is voor het bestrijden van potentiële pathogenen en anderzijds tolerantie tegen lichaamseigen antigenen in stand houdt. Vitamine D is een vetoplosbaar hormoon dat uit de voeding kan worden opgenomen of geproduceerd wordt in de huid. Boven op zijn klassieke rol in de calcium- en fosfaathuishouding speelt vitamine D een prominente rol in het immuunsysteem. Bovendien wordt vitamine D-deficiëntie geassocieerd met een verhoogde vatbaarheid voor auto-immuunziekten, zoals reumatoïde artritis. In dit artikel worden de effecten van vitamine D op verschillende cellen van het aangeboren (o.a. macrofagen en dendritische cellen) en het verworven (o.a. B- en T-cellen) immuunsysteem beschreven. Daarnaast wordt een overzicht gegeven van genetische, epidemiologische en interventiestudies die een mogelijke rol aantonen voor vitamine D in de pathogenese en de behandeling van reumatoïde artritis.

## METABOLISME EN WERKINGSMECHANISME VAN VITAMINE D

Vitamine D, of cholecalciferol, is een prohormoon dat uit de voeding (bv. vette vis, levertraan) opgenomen wordt. De voornaamste bron van vitamine D is echter de endogene productie in de huid door ultraviolet (uv) B-gemedieerde fotosynthese. In mens en dier wordt vitamine D<sub>3</sub> geproduceerd, terwijl schimmels en planten vitamine D<sub>2</sub> maken. Dit artikel focust voornamelijk op de effecten van vitamine D<sub>3</sub>.

Vitamine D<sub>3</sub> vereist twee opeenvolgende hydroxylatiestappen voor de omzetting naar het bioactieve metaboliet 1,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>], ook calcitriol genoemd. In de lever wordt vitamine D<sub>3</sub> gehydroxyleerd door 25-hydroxylases (o.a. cytochroom P450 2R1, CYP2R1) wat resulteert in de vorming van 25-hydroxyvitamine D<sub>3</sub> [25(OH)D<sub>3</sub>]. In de circulatie is 25(OH)D<sub>3</sub> de voornaamste vorm van vitamine D<sub>3</sub>, die daarom wordt gebruikt om de vitamine D<sub>3</sub>-

status te bepalen. Serumwaarden van 25(OH)D<sub>3</sub> rond 20 ng/ml zijn nodig voor calciumhomeostase en gezonde botten, terwijl hogere waarden (40-80 ng/ml) waarschijnlijk vereist zijn voor de immunomodulerende effecten (1). Echter, zulke hoge dosissen veroorzaken calcemische bijwerkingen bij langdurige toediening. Een tekort aan vitamine D<sub>3</sub> (deficiëntie < 20 ng/ml) kan tot pathologieën leiden waarvan rachitis, een musculoskeletale aandoening met de typische kromme benen, de bekendste is. Daarnaast zijn er associaties beschreven tussen vitamine D<sub>3</sub>-deficiëntie en cardiovasculaire aandoeningen, kanker, auto-immuunziekten en een verzwakte antimicrobiële weerstand. In de nieren ondergaat 25(OH)D<sub>3</sub> onder invloed van 1α-hydroxylase (CYP27B1) een tweede hydroxylatie waarbij het wordt omgezet in de bioactieve vorm 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Deze activerende enzymen worden ook in ander weefsel (o.a. placenta, huid en immuuncellen) teruggevonden. Daarenboven komt 24-hydroxylase (CYP24A1), het enzym verantwoordelijk voor de afbraak van vitamine D<sub>3</sub>, eveneens tot

expressie in de immuuncel. Dit laat toe de concentratie van  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in het directe micromilieu (autocrien) nauwkeurig te regelen, net als de acties van  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  op naburige cellen (paracrien) (2).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oefent zijn genomische effecten uit door te binden aan de vitamine D-receptor (VDR). De VDR is een ligand-gereguleerde transcriptiefactor die in zowat alle weefsels en celtypes, inclusief immuuncellen, in het lichaam tot expressie komt. De VDR vormt een heterodimeer met de retinoïd X-receptor (RXR) en dit VDR-RXR-complex zal specifieke DNA-sequenties, ook vitamine D-responsieve elementen (VDRE) genoemd, in de promotor van vitamine  $\text{D}_3$ -gereguleerde genen binden om vervolgens gentranscriptie te beïnvloeden (2, 3). Daarnaast kan  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ook snelle, niet-genomische effecten uitlokken die zich binnen seconden tot minuten na toevoeging van het hormoon voordoen en gemedieerd worden door een membraangebonden vorm van de VDR (4).

#### VITAMINE $\text{D}_3$ ALS MODULATOR VAN HET IMMUUNSISTEEM

De wijdverspreide expressie van de VDR en vitamine  $\text{D}_3$ -metaboliserende enzymen in zowat alle cellen van het immuunsysteem wijst op een belangrijke, immuunmodulerende rol voor  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (3). Door de lokale productie van  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zijn deze cellen in staat suprafysiologische concentraties te bekomen die nodig zijn voor immuunmodulatie. Hieronder bespreken we de modulerende effecten van  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  op verschillende celsubgroepen van het aangeboren en verworven immuunsysteem.

#### MACROFAGEN

Macrofagen zijn fagocyterende, antigeenpresenterende cellen (APC's), die deel uitmaken van de eerstelijns-verdediging tegen pathogenen. Tijdens een microbiële infectie worden macrofagen geactiveerd door pathogeengeassocieerde moleculaire patronen (PAMP's), zoals lipopolysacchariden, tot inflammatoire M1-macrofagen. M1-macrofagen worden gekenmerkt door de productie van pro-inflammatoire cytokinen en induceren antimicrobiële responsen. M2-macrofagen worden geactiveerd door interleukine (IL)-4 en IL-13 om wondheling, weefselhomeostase en immuunmodulerende activiteiten te bevorderen (5). Inflammatoire immuunsignalen, bv. interferon (IFN)- $\gamma$  of toll-like receptor (TLR)-activering, stimuleren de expressie van CYP27B1, wat de macrofaag toelaat lokaal het bioactieve metaboliet  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  te vormen (6). In macrofagen induceert  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  autofagie, fagosomale maturatie en de vorming van antimicrobiële peptiden zoals cathelicidinen en defensinen. Daarnaast vermindert

**Serumwaarden van  $25(\text{OH})\text{D}_3$  rond 20ng/ml zijn nodig voor calciumhomeostase en gezonde botten.**

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  de oppervlaktemerkerexpressie van co-stimulerende moleculen, zoals cluster van differentiatie (CD)80 en CD86, en de vorming van pro-inflammatoire cytokinen, bv. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 en tumornecrosisfactor (TNF)- $\alpha$ , en chemokinen (bv. CXCL9-11, CCL2) op een IL-10-afhankelijke manier. Hierdoor neemt de T-celstimulerende capaciteit van de macrofaag af (6, 7). Blootstelling aan  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  is echter niet in staat de polarisatie volledig om te buigen naar een anti-inflammatoir M2-fenotype (7).

#### DENDRITISCHE CELLEN

Dendritische cellen (DC's) zijn APC's die continu in de periferie patrouilleren en gespecialiseerd zijn in de opname en verwerking van antigenen. Na blootstelling aan inflammatoire signalen zullen de DC's matureren en vervolgens naar de lymfeklieren migreren, waar ze het antigeen presenteren aan T-cellen en zo een antigeenspecifieke immuunrespons uitlokken. Blootstelling aan  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  lokt veranderingen in de morfologie van de DC's uit, waardoor deze cellen adherent worden en spoelvormige dendriten vormen (8). Daarnaast induceert  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  een tolerogeen fenotype gekenmerkt door een verminderde expressie van antigeenpresenterende en costimulatoire moleculen en een afname in de productie van pro-inflammatoire cytokinen. Tegelijkertijd neemt de vorming van anti-inflammatoire cytokinen toe en brengen deze tolerogene DC's T-cel-inhiberende moleculen verhoogd tot expressie. Op deze manier kunnen tolerogene DC's het gedrag van T-cellen beïnvloeden, wat resulteert in inductie van hypo-responsiviteit en een shift in de polarisatie van T-helper (Th)1- en Th17-gemedieerde inflammatoire responsen naar tolerogene responsen met regulatoire T-cellen (Tregs) (8, 9). Het is interessant te weten dat deze veranderingen in het tolerogene DC-profiel stabiel zijn na verwijdering van  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (9).

De inductie van dit tolerogeen profiel door  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wordt vergezeld door een vroege en transcriptioneel gemedieerde, metabole reprogrammatie. Behandeling met  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  heeft een grote impact op de expressie van genen betrokken in metabole signaalwegen, zoals glycolyse, citroenzuurcyclus en oxidatieve fosforylatie. Deze observatie strookt met een eiwitstudie waarin  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , of zijn experimentele, minder calcemische analoog TX527, ingrijpende wijzigingen veroorzaakten in eiwitten die een rol spelen in het cytoskelet, eiwitbiosynthese of -afbraak en metabole signaalwegen. Hoewel zowel aerobe glycolyse als oxidatieve fosforylatie simultaan verhoogd worden door  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , was enkel het glucosemetabolisme essentieel om het tolerogene fenotype en functie van  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -gemoduleerde DC's te induceren (10).

## B-CELLEN

B-cellen zijn lymfocyten die bekend zijn voor hun rol in de productie van antilichamen, de vorming van B-celfollikels met kiemcentrumactiviteiten, antigeenpresentatie, de productie van pro-inflammatoire cytokinen of hun immunoregulerende activiteiten (Bregs). Bij activering reguleren B-cellen de expressie van de VDR en het vitamine D<sub>3</sub>-metaboliserende enzym CYP27B1 op, een indicatie voor een direct effect van 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> op de B-cel. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induceert B-celapoptose, inhibeert de vorming van B-geheugencellen en verhindert de differentiatie van B-cellen in Ig-producerende plasmacellen (11). Dit reflecteert in lagere secretie van IgG en IgM in vitro na blootstelling aan 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Hoewel de inhiberende effecten op Ig-productie niet bevestigd zijn in vivo, werd aangetoond dat 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> de vorming van antigeenspecifieke antilichamen beïnvloedt (7, 10). Het effect van 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> op de antigeenpresenterende capaciteit van B-cellen is niet duidelijk. Daarnaast vertonen B-cellen blootgesteld aan 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> een verminderd costimulator activeringsprofiel (bv. CD40-ligand), wat resulteert in een beperkte activering, expansie en cytokineproductie van autologe T-cellen (12). Tot slot induceert 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> de productie van IL-10 door naïeve B-cellen en verhoogt het de expressie van CCR10 op uitgedifferentieerde humane B-cellen (7).

## T-CELLEN

Zoals hierboven beschreven kan 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> het gedrag van T-cellen indirect beïnvloeden door zijn effecten op APC's. Echter, de aanwezigheid van de VDR in geactiveerde T-cellen toont dat de T-cel ook een direct doelwit van 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is.

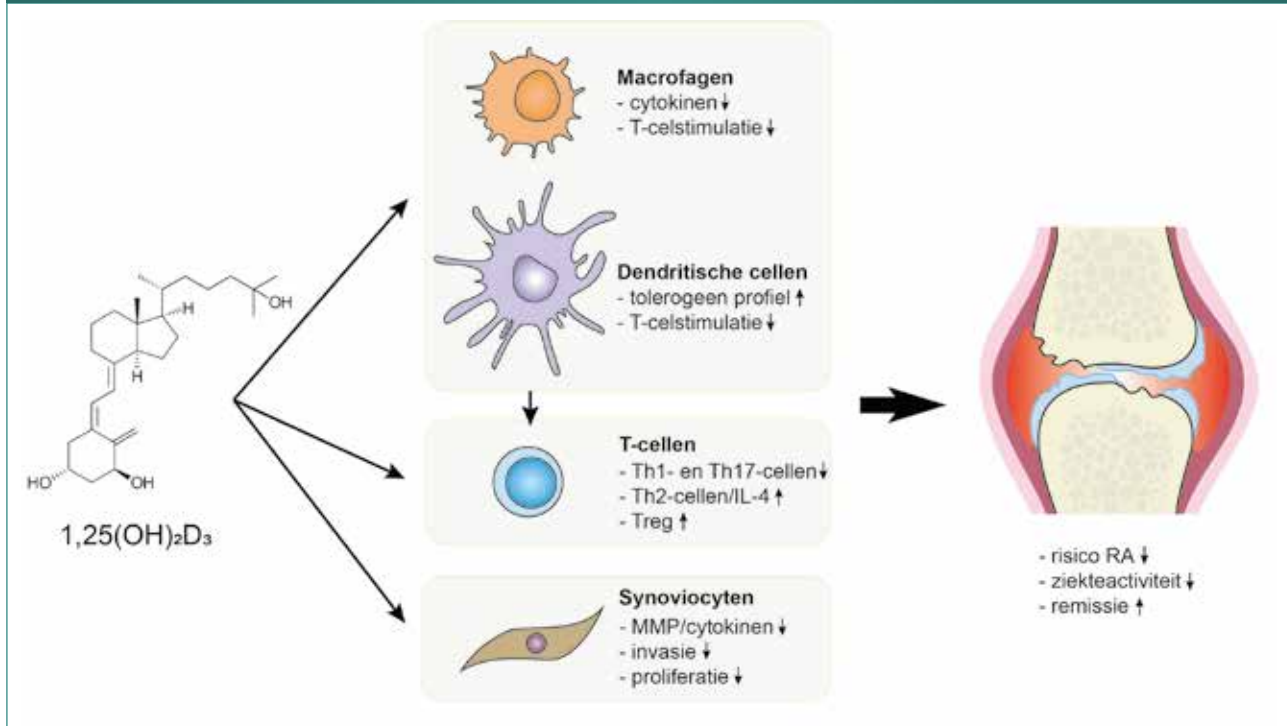
Tijdens activering zullen naïeve CD4<sup>+</sup> T-cellen differentiëren in een van de Th-sublijnen, zoals Th1-, Th2-, Th9-, Th17-cellen of induceerbare Tregs, waarbij ze een welbepaalde functie verwerven om specifieke pathogenen te bestrijden. Deze activering gaat gepaard met de inductie van zowel VDR-expressie als van vitamine D<sub>3</sub>-metaboliserende enzymen (3). Bijgevolg vermindert 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> de productie van inflammatoire cytokinen IFN-γ, IL-9 en IL-17 door respectievelijk CD4<sup>+</sup> Th1-, Th9- en Th17-cellen en beïnvloedt op deze manier de functie van de T-cellen. De directe effecten op Th2-gerelateerde cytokinen en T-celproliferatie staan momenteel nog ter discussie (7). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en het analoog TX527 induceren een stabiel CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>-Tregfenotype met IL-10-productie en een suppressieve capaciteit. Daarnaast stimuleert 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> de expressie van chemokine-receptoren verantwoordelijk voor migratie naar de huid en plaats van ontsteking, waarbij het het migratiepatroon naar specifieke weefsels bepaalt (13). In de geconserveerde, niet-coderende sequenties van de FoxP3-promoter zijn meerdere VDRE's geïdentificeerd, die erop wijzen dat 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> de FoxP3-genexpressie rechtstreeks beïnvloedt (14).

CD8<sup>+</sup> cytotoxische T-cellen zullen na activering snel prolifereren en geïnfecteerde cellen doden via apoptose. Hierbij worden cytokinen zoals perforine, granzyme B, IFN-γ en TNF-α gesecreteerd. De hoogste VDR-expressieniveaus van alle immuuncellen werden gedetecteerd in CD8<sup>+</sup> T-cellen (15). De intra-epitheliale lymfocyt populatie in de darm bevat grote aantallen CD8α<sup>+</sup> T-cellen en zijn belangrijk voor inductie van tolerantie. VDR-knock-outmuizen vertonen lagere aantallen CD8α<sup>+</sup> T-cellen, wat mogelijk bijdraagt tot de overmatige gastro-intestinale ontstekingen geobserveerd in deze muizen. Daarnaast verlaagt calcipotriol, een vitamine D<sub>3</sub>-analoog, de frequentie van CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T-cellen in psoriatische huidletsels (7).

## VITAMINE D<sub>3</sub> EN REUMATOÏDE ARTRITIS

Reumatoïde artritis (RA) is een chronische, immunogemedieerde ziekte die gekenmerkt wordt door inflammatie van de synoviale gewrichten en vernietiging van bot en kraakbeen, wat uiteindelijk leidt tot invaliditeit en verhoogde mortaliteit (7). Genetische studies tonen een associatie tussen VDR-polymorfismen en het risico om RA te ontwikkelen. Bijvoorbeeld, het 'F'-allel van het VDR-*FokI*-polymorfisme is geassocieerd met RA in de Europese populatie (16). Daarnaast correleert het VDR-polymorfisme *BsmI* eveneens met de ernst van de ziekte en werden verschillende VDRE's geïdentificeerd in RA-susceptibiliteitsgenen (7, 17). Opmerkelijk werd een verhoogd RA-risico en lagere vitamine D<sub>3</sub>-status geobserveerd op hogere geografische breedtegraden (18). Dit komt overeen met de waarneming dat hoge dosissen uv B-straling het risico op RA kunnen verlagen (19). Over het algemeen hebben patiënten met RA lagere 25(OH)D<sub>3</sub>-serumwaarden in vergelijking met gezonde controles. Een meta-analyse bevestigde de eerdere observaties dat lage serumwaarden voor 25(OH)D<sub>3</sub> invers gecorreleerd zijn met RA-susceptibiliteit en ziekteactiviteit (20). Orale supplementie met 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> voorkomt de initiatie en progressie van artritis in muismodellen met collageengeïnduceerde artritis (CIA) of lymeartritis (21). Een prospectieve cohortstudie met 29.368 vrouwen toonde aan dat bijkomende vitamine D<sub>3</sub>-inname via het dieet over een periode van 11 jaar omgekeerd gerelateerd is aan het risico om RA te ontwikkelen (20). Een gunstig effect van vitamine D<sub>3</sub>-suppletie [50.000IU vitamine D<sub>3</sub> of 25(OH)D<sub>3</sub> per week] boven op de standaardtherapie voor RA, op ziekteactiviteit, gevoelige en gezwollen gewrichten en het terugvalpercentage werd eveneens waargenomen (22, 23). Supplementie met een hoge dosis alfacalcidol (2μg/dag, oraal) zorgde voor een positief effect op ziekteactiviteit in 89% van de patiënten en veroorzaakte volledige remissie in 45% van de patiënten (20). Ondanks het feit dat significantie vaak niet bereikt werd in deze studies door de lage steekproefomvang, kunnen deze veranderingen wel klinisch relevant zijn. De pathogenese van RA is geassocieerd met de productie

**Figuur 1:** De gunstige effecten van actief vitamine D<sub>3</sub> op reumatoïde artritis (RA). De bioactieve vorm van vitamine D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, oefent immuunmodulerende effecten uit op verschillende cellen van het aangeboren (o.a. macrofagen en dendritische cellen) en verworven (o.a. T-cellen) immuunsysteem alsook op synoviocyten, die zich binnen het gewricht in het synovium bevinden en een belangrijke rol spelen in de pathogenese van RA. In macrofagen inhibeert 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> de productie van pro-inflammatoire cytokinen en induceert het in dendritische cellen een toleroog profiel. Het effect op beide celtypen resulteert in een verminderde T-celstimulatie. Daarnaast beïnvloedt 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ook rechtstreeks de T-cellen waarbij het de differentiatie van Th1- en Th17-cellen remt en de vorming van Th2-cellen en regulatoire T-cellen (Treg) stimuleert. Daarnaast vermindert 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> de productie van matrixmetalloproteïnases (MMP) en cytokinen, terwijl het eveneens de invasie en proliferatie van de synoviocyten remt. Deze effecten op celniveau correleren met een lager risico om RA te ontwikkelen, reduceren ziekteactiviteit en kunnen zelfs tot volledige remissie leiden.



van pro-inflammatoire cytokinen IL-1 $\beta$ , IL-6 en TNF- $\alpha$  door geactiveerde macrofagen aanwezig in het synoviale vocht. Deze cytokinen induceren synovitis en de productie van matrixmetalloproteïnases (MMP), wat resulteert in gewrichtsschade (24). Tijdens de actieve fase van RA spelen zowel Th1- als Th17-responsen een belangrijke rol en dragen IFN- $\gamma$  en IL-17 bij tot de synoviale ontsteking (25). Patiënten met RA hebben verhoogde aantallen Th17-cellen en dit evenredig met de ernst van de ziekte. Deze Th17-cellen stimuleren osteoclastogenese en activeren synoviale fibroblasten, wat de lokale inflammatie en gewrichtsdestructie enkel verergert (25). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is in staat verschillende cellen te moduleren, die alle bijdragen aan de gunstige effecten van vitamine D<sub>3</sub>-suppletie bij patiënten met RA (**Figuur 1**). In mononucleaire cellen uit het perifere bloed (PBMC's) van patiënten met RA remt 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> de IFN- $\gamma$  en IL-17 cytokineproductie door respectievelijk Th1- en Th17-cellen en induceert het een shift naar Th2-cellen, met verhoogde IL-4 niveaus. Th2-cellen treden

**Over het algemeen hebben patiënten met RA lagere 25(OH)D<sub>3</sub>-serumwaarden in vergelijking met gezonde controles.**

op als regulatoren en IL-4 voorkomt boterosie door de IL-17-productie te remmen (26). Verschillende groepen rapporteerden dat in patiënten met RA de perifere Treg-functie gestoord is door TNF- $\alpha$ -gemedieerde inhibitie (27).

Zowel 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> als zijn analoog TX527 bevorderen de vorming van een stabiel CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hoog</sup>CD127<sup>laag</sup>-Treg-fenotype met suppressieve activiteit (13). Als gevolg van de VDR-expressie in synoviale fibroblasten kan 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ook deze cellen rechtstreeks moduleren en inhibeert het de IL-1 $\beta$ -geïnduceerde productie van MMP1, alsook de invasie van RA-fibroblasten (28). Daarenboven remt behandeling met 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, of zijn analoog calcipotriol, langdurige proliferatie en in-vitrosecretie van pro-inflammatoire factoren, zoals

IL-6 en IFN- $\gamma$ , in synoviocyten (29). Tot slot, de behandeling van CIA-muizen met tolerogene DC's, die werden gemoduleerd met vitamine D<sub>3</sub> en het glucocorticosteroid dexametason en gepulsd met type II-collageen, verlaagde de frequentie van Th17-cellen en verminderde de ernst en progressie van de ziekte (30).

**CONCLUSIE**

Vitamine D<sub>3</sub>-deficiëntie wordt geassocieerd met een verhoogd risico voor verscheidene auto-immuunziekten, waaronder RA. Het is echter niet duidelijk of deze deficiëntie de oorzaak of het gevolg is van het verhoogde risico. Studies in vitro tonen aan dat vitamine D<sub>3</sub> een belangrijke rol speelt in de modulatie van immuuncelfenotype en -functie en muiscudies leverden belangrijke bewijzen voor de therapeutische effecten van vitamine D<sub>3</sub> in auto-immuniteit. Echter, de humane data voor vitamine D<sub>3</sub>-suppletie

in de klinische context zijn eerder beperkt. Dit kan worden toegeschreven aan de lage steekproefomvang of aan de gebruikte dosis vitamine D<sub>3</sub>, die mogelijk te laag is om immuunmodulerende effecten uit te lokken, bij sommige klinische studies. Daarentegen moet vitamine D<sub>3</sub>-toxiciteit te allen tijde vermeden worden. Daarom vormen de nog experimentele, niet-calcemische analogen van vitamine D<sub>3</sub> een zeer interessante tool om het therapeutische potentieel van vitamine D<sub>3</sub> verder te onderzoeken.

Referenties op [www.ortho-rheumato.be](http://www.ortho-rheumato.be)



## Sneller mobiel en pijnvrij\* na artroscopie



### VISCLOSEAL® SYRINGE:

- Hyaluronzuur als vervanger van de gewrichtsvloeistof na artroscopie
- Steriel verpakt voor het gebruik in het operatiekwartier
- Een voorgevulde injectiespuit 50 mg Natriumhyaluronaat/10ml

\* Mathies B., *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2007; 14 (1): 32–9  
Hempfling H., *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2007; 15 (5): 537–46

