

Hubungan Kadar Vitamin D Dengan Jumlah Sel T Regulator Pada Pasien Lupus Eritematosus Sistemik

Handono Kalim¹, Kusworini Handono², Dian Hasanah³

¹Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

²Laboratorium Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

³Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

E-mail : hankalim@ub.ac.id

ABSTRAK

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) merupakan penyakit autoimun yang semakin sering dijumpai dengan angka kematian tinggi. Etiopatogenesis penyakit ini belum begitu jelas, meskipun telah ditunjukkan adanya abnormalitas berbagai sel-sel imun termasuk hiper-reaktivitas sel T, sel B, sel dendrit; dan menurunnya fungsi sel T regulator (Treg). Vitamin D memiliki peran dalam pengaturan sistem imun. Penelitian pada ras Kaukasia menunjukkan bahwa kadar vitamin D yang rendah berkaitan dengan timbulnya penyakit autoimun termasuk LES. Peran vitamin D pada sistem imun pasien LES masih banyak kontroversi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan kadar vitamin D dengan jumlah sel Treg.

Penelitian ini adalah kasus-kontrol yang membandingkan jumlah sel Treg pada pasien LES dan kontrol sehat dengan melihat status vitamin D-nya. Kadar vitamin D pasien LES diukur dengan metoda ELISA, jumlah sel Treg (CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺) ditentukan dengan metoda *flowcytometri*.

Kadar vitamin D pada pasien LES lebih rendah daripada kontrol sehat ($p=0,000$) dan didapatkan korelasi negatif antara status vitamin D dengan persentase sel Treg (koefisien korelasi $-0,358$ dan $p=0,006$). Hal ini mungkin merupakan umpan balik positif untuk menanggulangi hiperreaktivitas dari sel T dan sel B.

Status vitamin D berkorelasi negatif dengan persentase sel Treg.

Kata kunci: LES, vitamin D, Treg.

PENDAHULUAN

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) merupakan suatu penyakit autoimun sistemik yang akhir-akhir ini semakin sering dijumpai. Meskipun secara umum angka harapan hidup 10 tahun penderita LES meningkat hingga mencapai 90% pada tahun 2000 di negara maju, penelitian Kalim dan kawan-kawan (2000) menunjukkan bahwa penderita LES di Indonesia mempunyai harapan hidup yang masih rendah, yakni untuk 5 tahun 70% dan untuk 10 tahun 55%.

Patogenesis LES hingga saat ini belum dapat diketahui dengan jelas. Adanya sel-sel sistem imun yang hiper-reaktif dan diproduksi autoantibodi patogenik yang pada akhirnya menyebabkan terjadinya peradangan sistemik dan kerusakan jaringan telah lama diketahui. Berbagai abnormalitas sel T, sel B, sel plasma, sel dendrit, serta sel T regulator (Treg) telah dilaporkan dalam berbagai penelitian (Mak CC dan Lau CS, 2003; Anolik JH, 2007; Jianxin J, 2009). Di samping itu sitokin diduga juga ikut berperan dalam patogenesis LES. Keseimbangan sitokin Th1/Th2 serta Th17 telah ditunjukkan berkaitan dengan berbagai manifestasi klinis LES (Sayed ME, 2008).

Akhir-akhir ini telah dilaporkan adanya hubungan antara rendahnya kadar vitamin D dengan timbulnya penyakit autoimun termasuk LES (Irastorza GR et al, 2008). Kurangnya paparan sinar matahari merupakan penyebab utama defisiensi vitamin D pada ras Kaukasia, karena sekitar 80% vitamin D dalam tubuh berasal dari previtamin D yang diproduksi di kulit yang diinduksi oleh sinar ultra violet B (Szodaray P et al, 2008).

Pada penelitian kami terdahulu ditunjukkan bahwa manifestasi klinis pasien LES di Indonesia berbeda dengan yang dilaporkan pada ras Kaukasia. Pasien LES Indonesia mempunyai manifestasi klinis yang lebih berat, lebih sering ditemukan antibodi anti dsDNA dan lebih sering menunjukkan gambaran fotosensitif (Handono K, 2000). Sedangkan negara Indonesia terletak di katulistiwa dengan paparan sinar matahari sepanjang tahun. Sehingga timbul pertanyaan apakah beratnya manifestasi klinis pasien-pasien LES di Indonesia juga dipengaruhi kadar vitamin D, serta bagaimana pengaruhnya terhadap fungsi sel Treg masih perlu dilakukan penelitian.

Reseptor vitamin D, yang meregulasi sekitar 3% genom manusia, diekspresikan oleh sel-sel imun, sehingga menimbulkan dugaan adanya efek imunomodulasi fisiologisnya pada sistem imun (Adorini L et al, 2009). Penurunan kadar 25(OH)D, yang digunakan untuk mengklasifikasikan status vitamin D, telah diamati pada berbagai penyakit autoimun. Selain itu, hipovitaminosis D sebagaimana rendahnya asupan vitamin D telah teridentifikasi sebagai faktor resiko untuk berkembangnya penyakit-penyakit autoimun, seperti diabetes tipe 1 atau multipel sklerosis (Holick MF, 2007).

Bukti-bukti yang terkumpul mendukung dugaan bahwa vitamin D dapat mencegah penyakit-penyakit autoimun dengan meningkatkan jumlah atau fungsi sel Treg natural. Sel Treg adalah limfosit T yang berfungsi untuk menekan sel-sel efektor sistem imun agar tidak bekerja secara berlebihan dan merugikan. Status vitamin D yang berkorelasi positif dengan fungsi sel Treg telah dibuktikan pada pasien-pasien dengan multipel sklerosis (Smolders J et al, 2009).

FoxP3, yang juga dikenal sebagai scurfin dan JM2, merupakan anggota *forkhead/winged-helix family of transcriptional regulator*. FoxP3 diekspresikan dominan pada sel Treg dan merupakan regulator utama untuk perkembangan dan fungsi sel Treg. Mutasi gen FoxP3 telah dikaitkan dengan manifestasi autoimun yang diamati pada tikus *scurfy* dan manusia dengan sindrom *immunedysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked* (IPEX) (Sakaguchi S et al, 2008). Pengaruh vitamin D terhadap sel Treg pada LES belum banyak diketahui.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan jumlah sel Treg pada pasien LES dengan status vitamin D yang berbeda (hipovitamin D dan normovitamin D) dan kontrol sehat.

METODE PENELITIAN

Populasi penelitian adalah pasien reumatik yang datang berobat ke Poliklinik Penyakit Dalam atau Ruang Rawat Inap Penyakit Dalam di RS. Dr. Saiful Anwar dalam kurun waktu 1 tahun. Sebagai kasus adalah pasien yang diagnosis LES oleh Dokter Ahli Penyakit Dalam Konsultan Reumatik berdasarkan kriteria ARA. Sebagai kontrol adalah orang sehat dengan kadar vitamin D normal dengan umur, jenis kelamin, dan suku bangsa yang sesuai. Sampel kasus

maupun kontrol direkrut secara proporsif random.

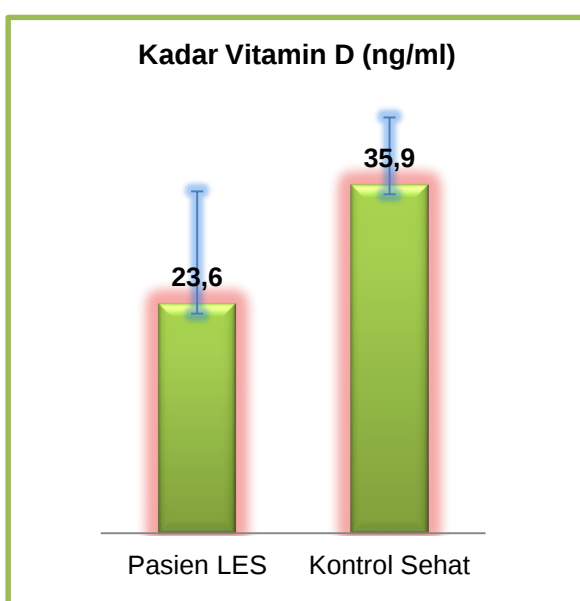
Penelitian mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/RS. Dr. Saiful Anwar Malang. Seluruh pasien LES yang diikuti dalam penelitian ini diminta untuk menandatangani lembar persetujuan (*Informed Consent*).

Baik pasien maupun kontrol diukur kadar vitamin D-nya. Kadar 25(OH)D3 dalam serum diukur dengan metoda *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* menggunakan kit ELISA dari Cusabio. Nilai normal adalah ≥ 30 ng/ml, insufisiensi adalah 20-29,9 ng/ml, dan defisiensi adalah < 20 ng/ml.

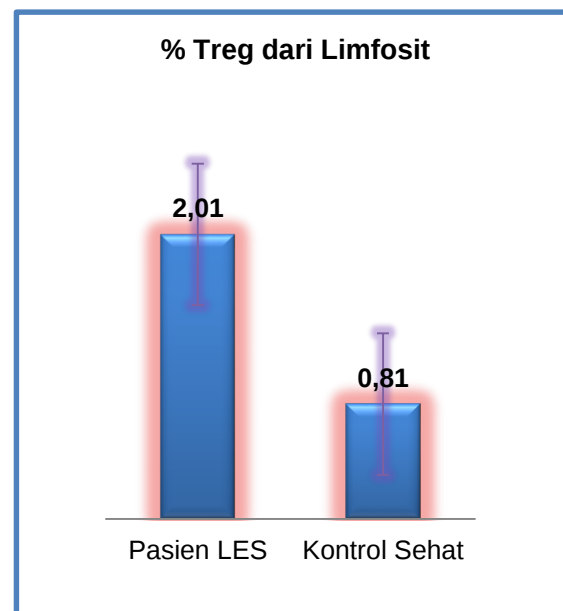
Jumlah sel T regulator adalah jumlah sel limfosit T yang mengekspresikan CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ yang diukur dalam darah menggunakan metode *flowcytometry* menggunakan BD FACScalibur. Label CD4 menggunakan fluoresens PerCyP, CD25 menggunakan PE, dan FoxP3 menggunakan FITC.

Software untuk analisis statistik yang digunakan adalah SPSS.

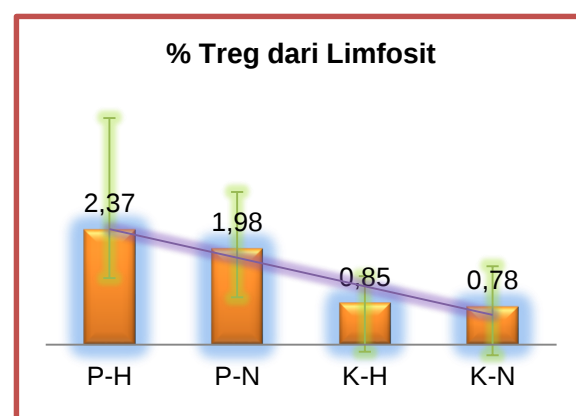
HASIL PENELITIAN



Gambar 1. Grafik perbandingan antara rerata kadar vitamin D pada pasien LES dan kontrol sehat. Rerata kadar vitamin D pada pasien adalah 23,6 ng/ml dan pada kontrol sehat adalah 35,9 ng/ml. Hasil ini signifikan dengan nilai $p=0,000$.



Gambar 2. Grafik perbandingan antara rerata persentase sel Treg pada pasien LES dan kontrol sehat. Rerata persentase sel Treg pada pasien adalah 2,01% dari limfosit dan pada kontrol sehat adalah 0,81% dari limfosit. Perbedaan ini signifikan, dengan nilai $p=0,015$.



Gambar 3. Hasil uji korelasi menunjukkan terdapat korelasi negatif antara status vitamin D dengan persentase sel Treg, dengan koefisien korelasi -0,358 dan $p=0,006$.

PEMBAHASAN

Sel Treg memainkan peran penting dalam menjaga toleransi perifer dan mencegah terjadinya penyakit autoimun. Hal ini diketahui dengan baik sejak penemuan awal sel Treg dengan salah satu petandanya berupa FoxP3. Mutasi FoxP3 telah diketahui menyebabkan penyakit *scurvy* pada tikus dan kemudian dapat mencetuskan penyakit autoimun yang parah yang mirip dengan penyakit pada manusia yang disebut IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*). Berbagai penelitian juga telah mengaitkan antara kejadian berbagai penyakit autoimun yang lainnya, termasuk lupus eritematosus sistemik, dengan penurunan jumlah absolut maupun persentase sel Treg. Penyakit-penyakit ini juga dikaitkan dengan penurunan fungsi supresi sel Treg terhadap sel-sel efektor.

FoxP3 merupakan molekul kunci bukan hanya untuk perkembangan dan fungsi sel Treg natural (nTreg) tetapi juga untuk Treg yang terinduksi atau diproduksi dari perifer (iTreg). Sel T CD4⁺ naif dapat berdiferensiasi menjadi sel Treg dengan adanya stimuli IL-2 dan TGF- β . Peningkatan ekspresi FoxP3 yang bersifat sementara dapat terjadi selama aktivasi, dan penemuan ini telah dilaporkan, tetapi aktifitas supresi dari sel ini masih banyak dipertentangkan.

Dalam penelitian kami, terdapat hasil yang bertentangan dengan sebagian besar hasil penelitian lainnya, di mana kami menemukan bahwa persentase sel Treg justru lebih besar pada pasien LES dan terdapat korelasi yang negatif antara status vitamin D dengan persentase sel Treg. Dugaan kami mengenai mekanisme ini adalah sebagai berikut. Peningkatan sel Treg pada darah perifer pada pasien LES mungkin bertujuan untuk meningkatkan cadangan sel Treg untuk mengatasi ekspansi dan

agresifitas dari sel-sel T dan B yang autoreaktif. Tetapi bagaimana sebenarnya fungsi sel Treg yang melimpah ini pada pasien LES belumlah terjawab dan masih membutuhkan penelitian lebih lanjut. Dari hasil penelitian-penelitian terdahulu, sebagian besar membuktikan bahwa fungsi sel Treg adalah lebih rendah pada pasien LES dibandingkan dengan kontrol sehat. Hal ini mungkin juga yang menyebabkan semacam umpan balik positif untuk proliferasi sel Treg maupun konversi sel T naif menjadi sel Treg. Penyebab lainnya mungkin karena meningkatnya resistensi sel T dan B yang autoreaktif terhadap supresi oleh sel Treg sehingga sel Treg yang dibutuhkan oleh pasien LES harus lebih besar dari orang-orang yang sehat.

Kadar vitamin D pada kontrol lebih tinggi daripada pasien LES, mungkin disebabkan adanya fotosensitifitas pada pasien LES sehingga pasien cenderung menghindari sinar matahari dan sintesis vitamin D-nya menjadi terganggu. Tampaknya kadar vitamin D yang rendah pada pasien tidak berkaitan dengan respon imun melalui sel Treg yang justru meningkat persentasenya.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah status vitamin D berkorelasi negatif dengan persentase sel Treg.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams JS and Hewison M, 2008. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 4(2): 80-90.
- Askenasy N, et al, 2008. Mechanism of T regulatory Cell Function. *Autoimmun Rev* 7: 370-5.
- Bikle D, 2009. Nonclassic Actions of Vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 94(1):26-34.

- Chen S, Sims GP, Chen XX, et al, 2007. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation. *J. Immunol* ; 179; 1634-1647.
- Costendaber KH, Feskanich Di, et al, 2008. Vitamin D intake and risk of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in women. *Ann Rheum Dis* : 67(4): 530-535.
- Ghoreishi M, et al, 2009. Expansion of Antigen-Specific Regulatory T Cells with The Topical Vitamin D Analog Calcipotriol. *J Immunol* 182: 6071-8.
- Ginanjar E, Sumariyono, Setiati S, Setiyohadi B, 2007. Vitamin D and Autoimmune Disease. *Acta Med Indones-Indones J Intern Med* 39 (3).
- Handono K, 2000. HLA klas II dan kerentanan genetik terhadap Lupus Eritematosus Sistemik di Indonesia. *Acta Med Ind XXXII*, 11-15.
- Horwitz DA, 2008. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future. *Arthritis Research & Therapy*, 10: 227.
- Iellem A, et al. Unique Chemotactic Response Profile and Specific Expression of Chemokine Receptors CCR4 and CCR8 by CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells. *J. Exp. Med. @ The Rockefeller University Press* 2001; 194(6): 847–853.
- Irastorza GR, Egurbide MV, Olivares N, et al, 2008. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology*, 47: 920-923
- Jianxin J, 2009. Up date on the role T cell sub set in the pathogenesis of systemic Lupus Erythematosus. The Chinese university Hongkong, Statin, Hongkong China
- Kalim H, Handono K, Suryana BP, dkk, 2000.
- Kamen DL, Cooper GS, Bouali H, et al, 2006. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Rev*, 5; 114-7.
- Kuhn A, Beissert S, and Krammer PH, 2009. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res*, 301;17-81
- Mak CC and Lau CS, 2003. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol*, 56: 481-490.
- Marco EC, Morales MM, Vila M, et al, 2010. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in patients with cutaneous lupus erythematosus in a mediterranean region. *Lupus* (2010)
- Miyara M, Amoura Z, Parizot C, et al, 2005. Global Natural Regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol*, 175; 8392-8400
- Mouyis M, Ostor AJK, Crisp AJ, et al, 2008. Hypovitaminosis D among rheumatology outpatients in clinical practice. *Rheumatology*, 47: 1348-1351
- Penna G, et al ,2005. Expression of The Inhibitory Receptor ILT3 on Dendritic Cells is Dispensable for Induction of CD4⁺FoxP3⁺ Regulatory T Cells by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. *Blood* 106: 3490-6
- Pita SM, Citore MJ, Castejon R, et al, 2006. Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 65: 553-554.
- Szodaray P., Nakken B., Gaal J, et al, 2008. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Standinavian Journal of Immunology* 68, 261-269.
- Thudi A, Yin S, Wandstrat AE et al, 2008. Vitamin D levels and disease status in Texas patients with lupus

- erythematosus. *Am J Med Sci*, 335: 99-104.
- Tischner D, et al. Polyclonal expansion of regulatory T cells interferes with effector cell migration in a model of multiple sclerosis. *Brain* 2006; 129: 2635–2647.
- Toubi E and Shoenfeld Y, 2010. The role of vitamin D in regulating immune responses. *IMAJ*, 12: 174-175.
- Valencia X, Yarboro C, Illei G and Lipsky PE, 2007. Deficient CD4⁺ CD25⁺ high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol*, 178; 2579-2588.
- Yates J, Whittington A, Mitchell P, et al, 2008. Natural regulatory T cells: number and function are normal in the majority of patients with lupus nephritis. *British society for immunology, Clinical and Experimental Immunology*, 153: 44-55.