

STRESZCZENIE

W przewlekłej chorobie nerek, już od 3 okresu PChN, występują zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej, których elementem jest obniżenie stężenia aktywnej witaminy D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}$]. Dostępne są tylko nieliczne doniesienia na temat stężeń aktywnej witaminy D u osób dializowanych i w populacji biorców przeszczepu nerki. Większość badań ogranicza się do pomiaru nieaktywnego prekursora witaminy D (25OHD).

Celem niniejszej pracy było określenie stężeń aktywnej i nieaktywnej witaminy D u chorych dializowanych HD, CADO, biorców przeszczepu nerki oraz u zdrowych ochotników. Cechą zaawansowanej przewlekłej choroby nerek jest upośledzenie odpowiedzi immunologicznej. W związku z tym, że aktywna witamina D oddziałuje na stan układu immunologicznego postanowiono ocenić zależności między zasobami witaminy D a składem populacji limfocytów, ze szczególnym uwzględnieniem subpopulacji limfocytów T.

W przeprowadzonym badaniu wzięło udział 146 pacjentów leczonych nerkozastępczo trzema różnymi metodami: hemodializą (HD), ciągłą ambulatoryjną dializą otrzewnową (CADO) i po przeszczepie nerek (PN). Grupa chorych HD liczyła 92 osoby w wieku średnio $61,2 \pm 16,7$ lat, grupa CADO 24 osoby w wieku średnio $53,5 \pm 13,3$ lat, a trzecia grupa liczyła 30 biorców przeszczepu nerki w wieku średnio $48,9 \pm 14,8$ lat. Dodatkowo w badaniu uczestniczyło 28 zdrowych ochotników w średnim wieku $53,2 \pm 16,6$ lat. Za pomocą standardowych metod oznaczono wskaźniki gospodarki wapniowo-fosforanowej (wapń, fosfor, fosfataza alkaliczna, parathormon), laboratoryjne wykładniki aktywności choroby (morfologię, stężenie białka całkowitego, albuminy, cholesterolu całkowitego w surowicy) oraz wykładniki stanu zapalnego (CRP). Krew na badania pobierana była w różnych porach roku.

Stężenie 25OHD (D_2 oraz D_3) w surowicy pacjentów oraz w grupie zdrowych ochotników oznaczano z wykorzystaniem testu immunoenzymatycznego ELISA firmy Euroimmun zgodnie z instrukcją producenta. Oznaczono również stężenie $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ w surowicy krwi przy pomocy kompetcyjnego, immunoenzymatycznego testu (EIA) firmy Immundiagnostik z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych, rozpoznających jednocześnie 1,25-dihydroksywitaminę D_2 oraz 1,25-dihydroksywitaminę D_3 , zgodnie z instrukcją producenta. Dodatkowo określono bezwzględną liczbę poszczególnych populacji limfocytów T we krwi obwodowej metodą cytofluorometryczną w cytometrze przepływowym (FACS Calibur, Becton Dickinson).

Najniższe stężenia 25OHD wykazano w grupie CADO z medianą 9,81 ng/ml. Ciężki niedobór witaminy D (< 10 ng/ml) w tej grupie chorych wykazano u 58% chorych, a niedobór (10–32 ng/ml) u 38% osób. Natomiast wśród pacjentów HD ciężki niedobór 25OHD obserwowano u 14% chorych, niedobór u 70% osób, a u 16% chorych wykazano optymalne stężenia tego metabolitu witaminy D. Należy podkreślić, że niedobór 25OHD (poniżej zakresu referencyjnego – 32 ng/ml) obserwowano aż u 82% zdrowych osób, przy czym ciężki niedobór witaminy D (< 10 ng/ml) stwierdzono u dwóch osób zdrowych (7%). U pacjentów po przeszczepieniu nerki ciężki niedobór kalcydiolu obserwowano u jednej osoby, a niedostateczne stężenie kalcydiolu (10 – 32 ng/ml) obserwowano u podobnego odsetka osób, jak u zdrowych ochotników, odpowiednio 77% i 75%. Podobnie wartości optymalne obserwowane były jedynie u odpowiednio 20% i 18% osób.

Pacjenci dializowani (HD i CADO) mieli znamienne niższe stężenia 1,25(OH)₂D w surowicy w porównaniu do pacjentów po przeszczepieniu nerki (mediana: 5,3 vs 29,27; p<0,0001) oraz zdrowych ochotników (mediana: 5,3 vs 32,6 pg/ml, p<0,0001). Niedobór 1,25(OH)₂D poniżej 17 pg/ml dotyczył 93% chorych dializowanych, niezależnie od zastosowanej metody dializoterapii. W grupie chorych dializowanych wykazano, że niedobór 1,25(OH)₂D był znacząco głębszy niż niedobór formy nieaktywnej witaminy D (25OHD). Pomimo stosowania u 28% pacjentów dializowanych substytucji witaminy D, w postaci alfakalcydolu, stężenie kalcydiolu oraz kalcytriolu we krwi pozostawało obniżone. W grupie PN, podobnie jak i u zdrowych osób stężenia 1,25(OH)₂D w granicach wartości referencyjnych obserwowano w porównywalnym odsetku (50% vs 65%).

Dodatkowo wykazano pozytywną korelację pomiędzy 1,25(OH)₂D a jego nieaktywnym metabolitem 25OHD w grupie CADO (p=0,0224) oraz w grupie HD, jednakże zależność ta była na granicy istotności statystycznej (p=0,0785).

Ponadto w porównaniu do grupy zdrowych ochotników u pacjentów dializowanych wykazano znaczące obniżenie całkowitej liczby limfocytów, limfocytów T, B, komórek NK (p<0,0001). U biorców przeszczepu nerki mimo stosowanego leczenia immunosupresyjnego skład populacji limfocytów był zbliżony do grupy kontrolnej, a obserwowano jedynie niższą liczbę limfocytów B (p=0,013).

W badaniach własnych najniższą liczebność populacji limfocytów T CD4⁺ oraz CD8⁺ obserwowano w grupie chorych HD, różnice te były znaczące w stosunku do biorców nerki (odpowiednio: p=0,0007; p=0,0002) oraz zdrowych ochotników (odpowiednio: p<0,0001; p=0,01). Natomiast liczba limfocytów T CD8⁺ w grupie po przeszczepie nerki zaznaczyła się

wyjątkowo wysokimi wartościami w porównywanych grupach (mediana 573 kom/ μ l; IQR 259,0÷1011,5 kom/ μ l), stanowiąc dwukrotność liczebności w porównaniu do grupy HD.

W badaniach własnych obserwowano również znamienne obniżenie liczebności limfocytów T CD4⁺CD28⁺ u chorych dializowanych w porównaniu do biorców nerki (p=0,0004) i zdrowych ochotników (p<0,0001). Podobnie wyglądała sytuacja w przypadku populacji limfocytów T CD8⁺CD28⁺. W szczególności najniższe liczebności tych subpopulacji limfocytów T obserwowano wśród chorych HD.

W przeprowadzonym badaniu oceniano również subpopulacje limfocytów T CD4⁺ oraz CD8⁺ bez ekspresji cząsteczki CD28, czyli komórek ostatecznie zróżnicowanych, starzejących się, o obniżonej zdolności do odpowiedzi na aktywację przy udziale komórek prezentujących antygen oraz w dużej mierze cytotoksycznych. Wyższe liczebności komórek o fenotypie CD3⁺CD4⁺CD28⁻ stwierdzono u chorych dializowanych (HD i CADO) oraz u biorców nerki w porównaniu do osób zdrowych grupy kontrolnej (odpowiednio: p=0,0048; p=0,0505). Najwyższe liczebności tych komórek obserwowano u chorych CADO, których było ponad 5-krotnie więcej w porównaniu do zdrowych ochotników (p=0,005). Natomiast największe liczebności populacji limfocytów T CD8⁺ bez ekspresji CD28 obserwowano u biorców nerki (PN) i różniły się istotnie w porównaniu do grupy HD (p=0,048) oraz na granicy istotności statystycznej u zdrowych ochotników (p=0,0644)

Dodatkowo w badaniach własnych wykazano, że w obrębie populacji limfocytów T CD8⁺, wykazujących ekspresję cytotoksycznej cząsteczki granzym B (GZMB), najwyższą liczbę stwierdzono u biorców przeszczepu nerki i różniła się znacząco w porównaniu do grupy chorych HD (p=0,0089) oraz zdrowych ochotników (p=0,046). Natomiast liczebność komórek o fenotypie CD3⁺CD4⁺GZMB⁻ oraz CD3⁺CD8⁺GZMB⁻ była dwukrotnie większa w grupie zdrowych ochotników niż w grupie HD (odpowiednio: p<0,0001; p<0,0001) oraz w grupie CADO (odpowiednio: p=0,0092; p=0,0056).

W przeprowadzonym badaniu oceniano również limfocyty T regulatorowe o fenotypie CD4⁺CD25^{High}CD127^{Low}. Wykazano znamienne obniżenie komórek regulatorowych w grupie pacjentów dializowanych (HD i CADO) w porównaniu do zdrowych osób (odpowiednio: p=0,0002; p=0,0402).

Nie obserwowano istotnych różnic w liczebności badanych subpopulacji limfocytów pomiędzy pacjentami dializowanymi różnymi technikami (HD vs CADO).

W pracy przeanalizowano również wpływ wieku na liczbę i skład limfocytów. Wykazano, że wraz z wiekiem malała liczebność subpopulacji limfocytów T. Najsilniej ta zależność została zaobserwowana u pacjentów HD i dotyczyła całkowitej liczby limfocytów

(rs=-0,285; p=0,0059), limfocytów T (rs=-0,279; p=0,0070), limfocytów B (rs=-0,350; p=0,0006), ponadto limfocytów T CD4⁺ (rs=-0,394; p=0,0001), limfocytów T CD4⁺CD28⁺ (rs=-0,429; p<0,0001), limfocytów T CD8⁺CD28⁺ (rs=-0,484; p<0,0001), limfocytów T o fenotypie CD4⁺GZMB⁻ (rs=-0,467; p<0,0001), limfocytów T o fenotypie CD8⁺GZMB⁻ (rs=-0,514; p<0,0001), komórek regulatorowych o fenotypie CD3⁺CD4⁺CD25^{High}CD127^{Low} (rs=-0,371; p=0,0003) oraz limfocytów T CD4⁻CD8⁻ (rs=-0,270; p=0,0091). Natomiast wraz z wiekiem wzrastała liczba limfocytów T CD4⁺CD28⁻ (rs=0,240; p=0,0212), limfocytów T CD4⁺GZMB⁺ (rs=0,293; p=0,0046), jak również (na granicy istotności) komórek NK (rs=0,204; p=0,0511).

W pracy własnej po raz pierwszy przeanalizowano zależności między zasobami witaminy D a poszczególnymi populacjami limfocytów T wśród pacjentów leczonych nerkozastępczo. Zaburzenia w składzie i liczbie poszczególnych subpopulacji linii T we krwi obwodowej nie pozostają (w zdecydowanej większości) w związku z zawartością nieaktywnego prekursora aktywnej witaminy D, jak również jej aktywnej postaci. Istotne zależności obserwowano jedynie w proporcji limfocytów CD4 do CD8, która rosła wraz ze wzrostem stężenia 25OHD wśród pacjentów po przeszczepieniu nerki. W grupie pacjentów dializowanych otrzewnowo wykazano istotną dodatnią korelację pomiędzy 1,25(OH)₂D a limfocytami T o fenotypie CD4⁺CD8⁺, natomiast w grupie chorych hemodializowanych obserwowano słabą ujemną korelację pomiędzy stężeniami 25OHD a limfocytami T o fenotypie CD4⁺CD8⁺.

Na podstawie uzyskanych wyników wysunięto następujące wnioski:

1. Niedobór witaminy D (25OHD) występuje powszechnie u chorych leczonych nerkozastępczo i u zdrowych ochotników, a stężenie kalcytriolu [1,25(OH)₂D] jest znacznie wyższe u pacjentów po przeszczepieniu nerki oraz osób zdrowych niż u chorych dializowanych.
2. Pozytywna zależność między stężeniami produktu wyjściowego 25OHD a stężeniem aktywnej formy witaminy D [1,25(OH)₂D] zaznaczyła się wyłącznie u chorych dializowanych.
3. U biorców przeszczepu nerki przy braku zmian stężeń prekursora witaminy D (25OHD) obserwowano istotne zwiększenie jej aktywnej formy kalcytriolu, co stawia pod znakiem zapytania praktyczną przydatność oznaczania zasobów witaminy D w postaci stężeń 25OHD u chorych leczonych nerkozastępczo.
4. U osób dializowanych występuje znacząca limfopenia w obrębie badanych populacji limfocytów w porównaniu do osób zdrowych.

5. Chorzy leczeni nerkozastępczo wykazali znaczące obniżenie populacji limfocytów B w porównaniu do osób zdrowych.
6. Nie wykazano różnic w liczebności poszczególnych populacji limfocytów w zależności od metody dializoterapii (HD i CADO).
7. Cechą wyróżniającą zaburzenia w składzie limfocytów T są:
 - a. u chorych hemodializowanych znaczne obniżenie całkowitej liczby limfocytów, populacji limfocytów T, B, komórek NK oraz poszczególnych subpopulacji limfocytów T,
 - b. u chorych dializowanych ciągłą ambulatoryjną dializą otrzewnową zwiększenie populacji głównie limfocytów T $CD4^+CD28^-$ oraz $CD4^+GZMB^+$ (fenotyp cytotoksycznych limfocytów) i umiarkowane obniżenie limfocytów B, komórek NK oraz pozostałych populacji limfocytów T,
 - c. u biorców przeszczepu nerki zwiększona liczebność limfocytów T $CD8^+$, a szczególnie tych o fenotypie $CD8^+CD28^-$ i $CD8^+GZM^+$ (fenotyp cytotoksycznych limfocytów), ponadto skład populacji limfocytów jest zbliżony do osób zdrowych grupy kontrolnej mimo stosowanego leczenia immunosupresyjnego.
8. Zaburzenia w liczebności limfocytów, populacji limfocytów T, B, komórek NK oraz poszczególnych subpopulacji limfocytów T nie pozostają w zdecydowanej większości w związku ze stężeniami 25OHD, jak również jej aktywnej postaci.

SUMMARY

Disturbances in calcium and phosphate metabolism are inevitable just after 3 stage of chronic kidney disease (CKD). Declining levels of vitamin D throughout CKD stages are one of the reasons. There are only few published reports about active vitamin D in dialyzed patients and renal transplant recipients (RTR). Most studies are limited only to investigate calcidiol (25OHD) status.

The aim of the study was to evaluate active [1,25(OH)₂D] and inactive form of vitamin D (25OHD) levels in patients undergoing hemodialysis, continuous ambulatory peritoneal dialysis, renal transplant recipients and healthy volunteers. Because of common immune deficiency in chronic kidney disease and effects of vitamin D on the immune system, correlation between vitamin D and lymphocytes populations and T cell subpopulations was verified.

The study included 146 patients treated with three types of renal replacement therapy: hemodialysis (HD), continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and kidney transplantation (KTX). HD group included 92 patients, with the mean age of $61,2 \pm 16,7$ years, CAPD 24 patients ($53,5 \pm 13,3$ years) and RTR comprised of 30 patients ($48,9 \pm 14,8$ years). Moreover 28 healthy volunteers were enrolled for this study as a control group with a mean age $53,2 \pm 16,6$ years.

Immunological and biochemical lab tests, such as calcium and phosphate metabolism (calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, PTH), moreover WBC, hemoglobin, serum protein, albumin, total cholesterol, and CRP were measured using commercially available tests. The blood was collected in various seasons.

25OHD (calcidiol) and 1,25(OH)₂D (calcitriol), both D₂ and D₃, concentrations were measured by ELISA method (respectively: Euroimmun, Germany; Immundiagnostik, Germany) according to the manufacturer instruction. Furthermore the number of T, B lymphocytes, NK cells and T cell subpopulations were measured by flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson).

In the study population, the lowest 25OHD levels were observed in patients treated with CAPD, with median 9,81 ng/ml. 58% of these patients exhibited severe vitamin D deficiency (<10 ng/ml), and only 14% of HD patients. It is worth to emphasize, that 25OHD deficiency, below 32 ng/ml was found surprisingly in 82% of healthy volunteers. After all, RTR and healthy controls exhibited 25OHD insufficiency (10–32 ng/ml) in comparable

frequency (respectively: 77% and 75%). Likewise, vitamin D sufficiency was observed in 20% and 18%, respectively.

To the contrary the concentrations of 1,25(OH)₂D were significantly lower in blood samples from dialyzed patients (both HD and CAPD) compared to RTR ($p < 0,0001$) and healthy volunteers ($p < 0,0001$), with a median 5,02 pg/ml and 6,41 pg/ml, respectively. 1,25(OH)₂D deficiency (< 17 pg/ml) was found in 93% of dialyzed patients independently from dialysis method. In the groups calcitriol deficiency was much deeper than calcidiol deficiency. Despite of receiving alfacalcidol therapy in 28% HD and CAPD patients, calcidiol and calcitriol levels were still low. Similarly to healthy control in KTX group 1,25(OH)₂D levels within reference range were in comparable frequencies (RTR vs healthy control: 50% vs 65%).

In own study relationship between 25OHD and its active metabolite 1,25(OH)₂D was positive but only in CAPD group ($p = 0,0224$), and in HD group was observed a marginal trend toward significance ($p = 0,0785$).

In patients treated with dialysis significantly lower numbers of T, NK cells were observed, as compared to RTR and healthy volunteers ($p < 0,0001$). Despite immunosuppressive treatment in RTR lymphocytes composition was similar to healthy control group. Only B cells were very low, both in patient treated with dialysis and RTR, compared to healthy volunteers. The lowest CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts occurred in HD patients, and the difference were statistically significant compared to RTR (respectively: 0,0007; $p = 0,0002$), and healthy volunteers (respectively: $p < 0,0001$; $p = 0,01$). In RTR group CD8⁺ T cells were almost twice as high as in other groups ($p < 0,0001$). Subpopulation of CD4⁺ T cells with the expression of CD28 were observed significantly lower in dialyzed patients compared to RTR ($p = 0,0004$) and healthy control ($p < 0,0001$). Differences were close enough when considering CD8⁺CD28⁺ T cell subpopulation between study groups. On the other hand CD4⁺ T cells without CD28 expression were over 5-times higher in CAPD group ($p = 0,005$) compared to healthy individuals. However CD8⁺ T cells without CD28 expression were the highest in RTR (vs HD and healthy control: $p = 0,048$; $p = 0,0644$). Likewise, CD8⁺ T cells with granzyme B expression were higher in RTR than in HD group ($p = 0,0089$) or healthy volunteers ($p = 0,046$). Furthermore significant decrease in CD4⁺CD25^{High}CD127^{Low} subpopulation of T_{regs} in HD and CAPD patients compared to healthy individuals (respectively: $p = 0,0002$; $p = 0,04$). Afterall the lowest counts of lymphocytes were present before all else in hemodialyzed patients.

In the study the relationship between age and lymphocytes and T cell subpopulations was analyzed. Generally, number the cells decrease with age. Significant inverse correlation between age and lymphocytes ($rs=-0,285$; $p=0,0059$), T cells ($rs=-0,279$; $p=0,0070$), B cells ($rs=-0,350$; $p=0,0006$), $CD4^+$ T cells ($rs=-0,394$; $p=0,0001$), $CD4^+CD28^+$ T cells ($rs=-0,429$; $p<0,0001$), $CD8^+CD28^+$ T cells ($rs=-0,484$; $p<0,0001$), $CD4^+GZMB^-$ T cells ($rs=-0,467$; $p<0,0001$), $CD8^+GZMB^-$ T cells ($rs=-0,514$; $p<0,0001$), $CD4^+CD25^{High}CD127^{Low}$ T_{reg} cells ($rs=-0,371$; $p=0,0003$), $CD4^+CD8^-$ T cells ($rs=-0,270$; $p=0,0091$), and positive with $CD4^+CD28^-$ T cells ($rs=0,240$; $p=0,0212$), $CD4^+GZMB^+$ T cells ($rs=0,293$; $p=0,0046$), NK cells ($rs=0,204$; $p=0,0511$) was marked the most in hemodialyzed patients.

The relationship between vitamin D status and lymphocyte populations and T cell subpopulations were analysed for the first time in patients with stage 5 CKD on dialysis and RTR. However significant positive associations were observed only between 25OHD and proportion of CD4 to CD8 T cells in RTR. In patients under CAPD 1,25(OH)₂D positively correlated with $CD4^+CD8^+$ T lymphocytes. In hemodialyzed patients 25OHD inversely correlated with $CD4^+CD8^+$ T lymphocytes.

The following conclusions were drawn based on study results and carried out statistical analysis:

1. Vitamin D (25OHD) deficiency is common in patients treated with renal replacement therapy and in healthy control group, however calcitriol concentrations [1,25(OH)₂D] are much higher in RTR and in healthy volunteers than in patients on dialysis.
2. The positive correlation between inactive precursor 25OHD and active form of vitamin D [1,25(OH)₂D] was observed exclusively in patients under dialysis.
3. In RTR no change in calcidiol levels was observed, whilst calcitriol increased significantly, wherefore the usefulness of measuring 25OHD as the vitamin D status in dialyzed patients and RTR is questioned.
4. Lymphocytes, T, B and NK cells, and most of T cell subsets deficiency is observed in patients under dialysis.
5. B lymphocytes decreased significantly in patients treated with RRT compared to healthy volunteers.
6. There was no differences in particular lymphocytes count between patients treated with different dialysis methods.
7. The distinctive feature of lymphocytes composition disturbances are:
 - a. in HD patients strong decrease in lymphocytes, T, B, NK cells, and other T cells subsets,

- b. in patients treated with CAPD increase in $CD4^+CD28^-$ and $CD4^+GZMB^+$ T lymphocyte subpopulations (cytotoxic phenotype), and mild decrease in B, NK cells and other T cell subsets,
- c. in RTR increase in $CD8^+$ T cell subset, especially with the phenotype $CD3^+CD8^+CD28^-$ and $CD3^+CD8^+GZM^+$ (cytotoxic phenotype), moreover despite of immunosuppression therapy lymphocyte subpopulations count is similar to healthy individuals.

Disturbances in lymphocytes, T, B and NK cells, and most of T cell subsets do not correlate in the significant majority with neither 25OHD nor $1,25(OH)_2D$.