

Репаративные эффекты парикальцитола и кальцитриола в лечении кардиоренального синдрома и хронической нефропатии аллографта

А.Н. Харламов^{1*}, А.Н. Перриш¹, Я.Л. Габинский², Х. Ронне³, Е.Ю. Иванова³

¹ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Росздрава. Екатеринбург, Россия; ²ГБУЗ СО Уральский институт кардиологии. Екатеринбург, Россия; ³Университет Редбауда, Департамент фармакологии и токсикологии. Наймейхен, Нидерланды

Reparative effects of paricalcitol and calcitriol in patients with cardio-renal syndrome and chronic allograft nephropathy

A.N. Kharlamov^{1*}, A.N. Perrish¹, Ya.L. Gabinsky², Kh. Ronne³, E.Yu. Ivanova³

¹Ural State Medical Academy. Yekaterinburg, Russia; ²Ural Institute of Cardiology. Yekaterinburg, Russia; ³Radboud University, Pharmacology and Toxicology Department. Nijmegen, the Netherlands.

Цель. Определить место витамина Д в профилактике и лечении кардиоренального синдрома (КРС), хронической нефропатии аллографта (ХНА), репарации тканей почки и сердца.

Материал и методы. В рандомизированное, слепое, плацебо-контролируемое исследование включены 120 пациентов (русской и нидерландской национальности, реципиенты асистолических и трупных доноров, с дефицитом витамина Д. Пациенты разделены на 4 группы (гр.): гр. (n=28) парикальцитола (2-4 мкг/сут.), гр. (n=28) кальцитриола (1-6 мкг/сут. per os), гр. (n=26) диеты (пациенты получали витамин Д с мультивитаминами и из продуктов питания в дозе 1200-1800 МЕ/сут.), гр. (n=27) плацебо (плацебо с контролем диеты).

Результаты. Через 180 сут. степень ХНА составляла 1,24 в гр. парикальцитола и 1,22 в гр. кальцитриола в сравнении с 1,43 и 1,68 в гр. диеты и плацебо, соответственно (p<0,05). Скорость клубочковой фильтрации непосредственно после трансплантации изменилась на 180-й день в гр. парикальцитола, кальцитриола, диеты и плацебо (p<0,05). FACS анализ выявил количественную индукцию SP⁺ эпителиальных клеток почки и кардиомиоцитов на 180-й день (p<0,05). Пациенты с приемом парикальцитола, кальцитриола и в гр. диеты имели значительно повышенные уровни CD133, CD34, CD73, CD105 по сравнению с плацебо (p<0,01), что коррелировало с экспрессией ЯРВД в почке (p<0,05). Циркулирующие СПК продемонстрировали сравнительно высокий уровень экспрессии ЯРВД (p<0,05). ГКПС как одно из наиболее важных осложнений приема витамина Д у больных ХНА выявлено только у 4/28 (14 %) пациентов в гр. кальцитриола (p<0,001). Под влиянием антигипертензивной терапии АД снизилось после трансплантации со 180/101 мм рт.ст. до 143/87, 141/94, 147/102, и 165/101 мм рт.ст. в гр. соответственно (p<0,01). Функциональный класс ХСН (NYHA) снизился (p<0,01). Через 6 мес. после трансплантации средний балл по шкале CCS составлял 533/ 611 / 524 / 990 в гр., соответственно (p<0,05).

Заключение. Витамин Д — эффективное средство профилактики и лечения КРС и ХНА, стимулятор репарации тканей почки и миокарда. Наиболее оптимально для широкой клинической практики — использование аналога активной формы витамина Д парикальцитола в дозе 2-4 мкг, а также специальной диеты с мультивитаминами в дозировке до 1800 МЕ холекальциферола.

Ключевые слова: парикальцитол, кальцитриол, кардиоренальный синдром, трансплантация почки.

Aim. To study the role of vitamin D in the prevention and treatment of cardio-renal syndrome (CRS), chronic allograft nephropathy (CAN), as well as in the renal and cardiac tissue reparation.

Material and methods. This randomized, blind, placebo-controlled study included 120 vitamin D-deficient Russian and Dutch patients — recipients of asystolic and cadaver donor kidneys. All participants were divided into

©Коллектив авторов, 2011
e-mail: drskharlamov@gmail.com
Тел./ факс: +7(343)2577079

[¹Харламов А.Н. (*контактное лицо) — исследователь, врач-терапевт, ¹Перриш А.Н. — аспирант кафедры внутренних болезней № 3, ²Габинский Я.Л. — заведующий кафедрой внутренних болезней № 3, ²директор, ³Ронне Х. — ассистент профессора Департамента фармакологии и токсикологии, научный руководитель Центра клинических исследований Медицинского центра, ³Иванова Е.Ю. — исследователь].

4 groups: 28 subjects received paricalcitol (2-4 µg/d); 28 — calcitriol (1-6 µg/d per os); 26 — diet and multivitamins (daily vitamin D consumption of 1200-1800 IU); and 27 — placebo plus controlled diet.

Results. At Day 180, CAN severity reached 1,24 in the paricalcitol group and 1,22 in the calcitriol group, compared to 1,43 and 1,68 in the diet and placebo groups, respectively ($p<0,05$). Baseline glomerular filtration rate, measured immediately after the transplantation, was changed at Day 180 in all groups ($p<0,05$). FACS analysis revealed a qualitative induction of SP⁺ renal epithelial cells and cardiomyocytes at Day 180 ($p<0,05$). In the paricalcitol, calcitriol, and diet groups, the levels of CD133, CD34, CD73, and CD105 were significantly higher than in the placebo group ($p<0,01$), which was consistent with renal expression of nuclear vitamin D receptors, NVDR ($p<0,05$). Circulating stem progenitor cells (SPC) demonstrated a relatively high level of NVDR expression ($p<0,05$). Hypercalcemia, as one of the most important complications of vitamin D therapy in CAN patients, was observed only in 4 out of 28 participants (14 %) in the calcitriol group ($p<0,001$). Antihypertensive therapy resulted in the reduction of blood pressure levels, from 180/101 mm Hg at baseline to 143/87, 141/94, 147/102, and 165/101 mm Hg in the respective intervention groups ($p<0,01$). A decrease in the chronic heart failure functional class (NYHA classification) was also observed. Six months after the transplantation, mean CCS score was 533, 611, 524, and 990 in the respective groups ($p<0,05$).

Conclusion. Vitamin D is an effective medication for CRS and CAN prevention and treatment, which also stimulates renal and myocardial tissue reparation. In the clinical practice settings, the optimal forms of vitamin D therapy are treatment with an analog of active vitamin D — paricalcitol (204 µg/d), and special diet in combination with multivitamins (up to 1800 IU of cholecalciferol per day).

Key words: Paricalcitol, calcitriol, cardio-renal syndrome, renal transplantation.

Трансплантация почки улучшает прогноз и способствует увеличению выживаемости больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН) [1-3]. Хроническая нефропатия аллографта (ХНА) и осложнения кардиоренального синдрома (КРС) [4,5] остаются основными причинами потери графта и смертности больных в отдаленном периоде [2,6-8]. Тубулоинтерстициальный фиброз (ТИФ) и посттрансплантационный артериосклероз (ПТАС) — основные причины ХНА и потери графта в отдаленном периоде [1,9,10]. Данные последних лет показывают участие различных типов стволовых-прогениторных клеток (СПК) в патогенезе этих процессов [11-16]. Витамин Д и его ядерный рецептор может быть крайне привлекательной мишенью для терапевтического вмешательства в процессы репарации почки и миокарда.

1,25(ОН)₂D₃ — 1,25-дигидроксиголекальциферол (кальцитриол), витамин D₃ — это активированная форма витамина Д, секостероидный гормон [17-20], который в дополнение к его основной функции в кальциево-фосфатном обмене [19], обладает различными эффектами на рост, развитие и дифференциацию различных типов клеток, а также протективными, регенеративными, противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами [17,19]. Более того, витамин Д вовлечен более чем в 20 различных метаболических процессов в организме, являясь эссенциальным элементом и регулятором основных видов обмена веществ [18,19]. Биологические эффекты 1,25(ОН)₂D₃ реализуются с помощью ядерного рецептора витамина Д (ЯРВД) [20]. 1,25(ОН)₂D₃ и синтетические аналоги [21] показали высокую эффективность в экспериментальных моделях хронического повреждения аллографта [13], однако число клинических исследований крайне незначительно [22]. Более того,

общепризнанным фактом является наличие дефицита витамина Д [18] и высокого риска вторичного гиперпаратиреоза у больных ХПН [23], однако режим дозирования до сих пор является камнем преткновения для широкого использования в клинической практике из-за риска развития кальциемических и фосфатемических осложнений [24].

Аналоги активной формы витамина Д были синтезированы с целью подавления паратиреоидной активности и минимизации негативных эффектов кальцитриола на кальциевый обмен и повсеместную активацию ЯРВД. Парикальцитрол, или 19-пог-1,25(ОН)₂D₂, является одним из наиболее эффективных и популярных аналогов активной формы витамина Д. Имеются немногочисленные исследования инъекционной формы парикальцитрола, посвященные его использованию в лечении хронической болезни почек (ХБП), особенно у больных находящихся на гемодиализе, однако его эффективность у больных после трансплантации почки с КРС, особенно формы *per os*, не тестировалась [25-29].

Другой стороной медали ХНА и трансплантации почки является проблема КРС. Термин КРС может использоваться для описания негативного влияния снижающейся функции почки на сердце и кровообращение [4,5,10]. К сожалению, ишемическая болезнь сердца (ИБС) по статистике является одной из основных причин смерти у больных ХПН и ХНА, причем риск смерти от осложнений ИБС в данной группе (гр.) больных в 10-15 раз выше, чем в общей популяции. Пациенты с ХНА, кроме классических, имеют и факторы риска (ФР), ассоциированные с трансплантацией почки, такие как иммуносупрессия, ХПН в анамнезе, протеинурия и системные признаки воспаления [4,7]. Известно, что активированная форма 1,25(ОН)₂D₃ имеет как

геномные, так и быстрые негеномные эффекты в клетках сердца [6, 8, 30]. При этом роль кальцитриола в лечении ССЗ у больных ХНА неизвестна, что делает актуальным настоящее исследование.

Целью исследования было определить место разных форм и дозировок витамина Д, как инструмента новой терапевтической стратегии, в профилактике и лечении КРС, репарации и регенерации тканей почки и сердца, а также редуцировании риска ССЗ у больных ХНА.

Материалы и методы

В рандомизированное, слепое, плацебо-контролируемое исследование включены 120 пациентов русской и нидерландской национальностей, средний возраст 58 лет, мужчины, реципиенты асистолических и трупных доноров, с дефицитом витамина Д, определенным как $25(\text{OH}) \text{vitD} < 40 \text{ нмоль/л}$. Пациенты разделены на 4 гр. (таблица 1): гр. (n=28) парикальцитиола — больные получали 2-4 мкг/сут. *per os*, гр. (n=28) кальцитриола — больные получали 1-6 мкг кальцитриола в сут. *per os*, гр. (n=26) диеты — пациенты получали витамин Д с мультивитаминами и из продуктов питания, содержащих витамин Д, в дозе 1200-1800 МЕ/сут. под контролем диеты, гр. (n=27) плацебо — реципиенты почки получали капсулу плацебо с контролем диеты и поступлением витамина Д не более 400-900 МЕ в сут. Капсулы для лекарственного витамина Д, мультивитаминов и плацебо имели одинаковую форму, размер и цвет с целью защиты слепоты исследования. Лечение витамином Д во всех гр. начиналось на 5 сут. после трансплантации почки, и наблюдение продолжалось до 6 мес. Наблюдение за некоторыми пациентами было продолжено до 12 мес. с целью эпидемиологического анализа заболеваемости и смертности реципиентов, а также проведения исследования миокарда у пациентов, перенесших аортокоронарное шунтирование (АКШ). Критериями исключения служили: текущие заболевания в острой фазе; жизнеугрожающие состояния; психические нарушения, включая деменцию, явления депрессии и психоза; эндокринологические болезни, включая сахарный диабет (СД), гиперпаратиреозидизм и др. заболевания щитовидной или паращитовидных желез; онкологические, инфекционные заболевания; злоупотребление алкоголем или наркотическими средствами. 11 из 120 рандомизированных пациентов были исключены из исследования в связи с нарушением протокола. Все пациенты подписывали информированное согласие на участие на всех этапах исследования. Протокол и дизайн исследования утверждены Локальным этическим комитетом Медицинского центра Университета Редбауда (г. Наймейхен, Нидерланды) и ГБУЗ СО “Уральский институт кардиологии” (г. Екатеринбург).

Пациентам не рекомендовали избегать нахождения на солнце, однако проводились беседы об ограничении продолжительности естественной инсоляции в связи с повышенным риском меланомы кожи. Исследование проводилось в период с октября по апрель, что исключало повышенную инсоляцию. Учитывая объем инсоляции в Наймейхене (широта 51°N , долгота 51°E) и Екатеринбурге (широта 56°N , долгота 60°E), а также литературные данные [23], ожидаемая максимальная ежедневная эффективная доза витамина Д у пациентов с I-III типом кожи (преимущественно с I-II типом кожи

у нидерландцев и II-III типом кожи у русских) была $< 0,5-0,8 \text{ кДж/м}^2$.

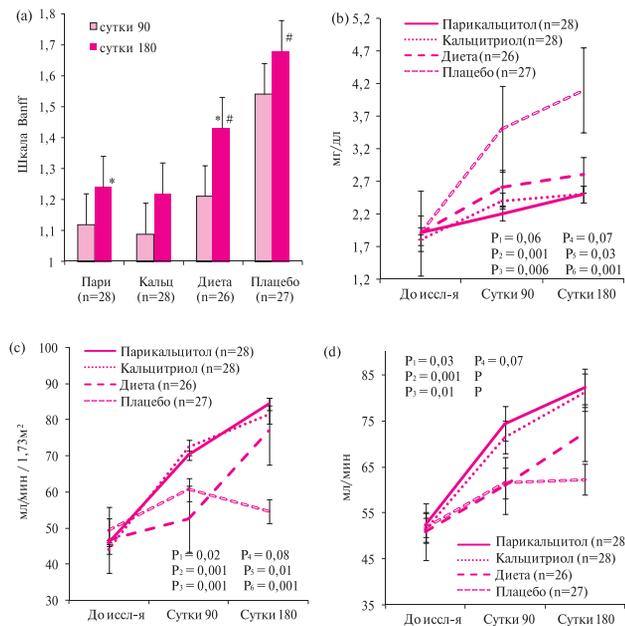
Все пациенты получали циклоспорин в дозе 8-10 мг/кг/сут. *per os*, или Неорал 4400-5000 мкг/час/л внутривенно (в/в) (3 мг/кг/сут.) с целевой концентрацией циклоспорина в крови 150-400 мкг/мл; контроль осуществлялся с использованием моноклональной иммунологической пробы. Среди других лекарственных средств использовались эналаприл, валсартан, амлодипин, фуросемид, метопролол, нитраты при необходимости, флувастатин или аторвастатин в различной дозировке. Калий-сберегающие и тиазидовые диуретики не назначали. В диете ограничивались белок (0,6 г/кг/сут.), калий ($< 2,7 \text{ г/сут.}$), фосфор ($< 700 \text{ мг/сут.}$) при поддержании высокой калорийности продуктов питания (40 ккал/кг).

Были выделены следующие конечные точки исследования. Первичной комбинированной конечной точкой была степень ХНА и функциональный класс (ФК) хронической сердечной недостаточности (ХСН) по классификации Нью-йоркской ассоциации сердца (NYHA) на 180-й день после трансплантации почки. Вторичными конечными точками являлись степень (ст.) ХНА на 90 сут. после трансплантации почки, скорость клубочковой фильтрации (СКФ) и уровень креатинина (Кр) сыворотки крови на 180 сут. после трансплантации почки, распределение СПК (SP-позитивной популяции, и “инкорпорированных” клеток) и CD133, CD34, CD73, CD105-позитивных клеток в крови и почечной ткани на 180 сут., CD-фенотип SP-клеток на 180 сут., экспрессия ЯРВД в стволовых клетках, тканях почки и сердца на 180 сут., частота гиперкальциемия-подобного синдрома (ГКПС), уровень систолического артериального давления (САД), диастолического артериального давления (ДАД), фракция выброса (ФВ), уровень мозгового натрийуретического пептида (МНУП) на 180 сут., уровень кальцификации коронарных артерий (КА) по шкале CCS (Coronary Calcium Score) до трансплантации и на 180 сут. после трансплантации почки.

Биохимические исследования проводились в соответствии с рекомендациями производителей соответствующих проб. Кальций сыворотки корректировали по протеинам по следующей формуле: скорректированный кальций (мг/дл) = общий кальций (мг/дл) + $0,0176 (34\text{-сывороточный альбумин (г/л)})$.

Диагноз ХНА ставился на основании морфологического анализа биоптатов почки на 90 и 180 сут. по классификации Banff 1997 в модификации от 2005г и 2007г [31]. СКФ рассчитывалась по модифицированной формуле, разработанной для больных ХПН, находящихся на диете: $\text{СКФ} = \text{экс} (5,228 - 1,124 \times \text{Кр} - 0,203 \times \text{возраст})$. Для подтверждения и уточнения СКФ использовалась $\text{Tc}^{99\text{m}}$ ДТРА ренография (сцинтиграфия почек). Данные о СКФ, полученные в гамма-камере, обозначены в исследовании как сцинтиграфическая СКФ = cСКФ.

Клетки почки и фрагменты солидной ткани были получены при биопсии почки в соответствии с рекомендациями нидерландских и российских профильных (нефрологических и хирургических) обществ и ассоциаций. Выделение SP-клеток и СПК проведено с использованием флюорисцент-активированной сортировки клеток (FACS, Beckman-Coulter), а также MACS и проточной цитометрии в соответствии с рекомендациями производителя. Для подсчета рибонуклеиновой кислоты (мРНК)



Примечание: пустые столбцы показывают результаты на 90-й день, а черные столбцы – на 180-й день. Парные различия были значительными для всех сравнений. * $p=0,008$, # $p<0,001$. P_1 – r для разницы между гр. кальцитриола и диеты. P_2 – r для разницы между гр. кальцитриола и плацебо. P_3 – r для разницы между гр. диеты и плацебо. P_4 – r для разницы между гр. парикальцитрола и кальцитриола. P_5 – r для разницы между гр. парикальцитрола и диеты. P_6 – r для разницы между гр. парикальцитрола и плацебо.

Рис. 1 Степень хронической нефропатии аллографта (а), уровень Кр (б), СКФ (с), и сцинтиграфическая СКФ (д) на 90-й и 180-й день ($p<0,05$ для всех сравнений между гр.).

использовалась полимеразная цепная реакция (ПЦР), проведенная с помощью Assays-on-Demand gene expression kits и ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). В таблице 2 приведена информация по нуклеотидным последовательностям праймеров, использованных для изучения необходимых генов.

Экспрессия ЯРВД определялась в гомогенизате почечной ткани по методу Pierce et al. (1987), и Sandgren и DeLuca (1990) из цельного экстракта почки или путем ELISA.

Подсчет степени кальцификации КА по шкале CCS осуществлен с помощью безконтрастного КТ-сканирования на Electron Beam CT (EBCT) scanner (e-Speed, manufactured by GE Healthcare, Milwaukee, WI).

По истечении 6 мес. основного наблюдения за пациентами, 10 пациентов подвергшихся АКШ продолжили исследование в течение последующих 6 мес. В связи с чем проведен, так называемый, post-hoc анализ морфологических изменений тканей миокарда (путем получения образца ткани ушка правого предсердия (УПП) во время венозной канюляции при АКШ – минимум по две трабекулы от каждого пациента, с размерами не более 1,5 0,5 см каждая), а также выживаемости больных после трансплантации почки в течение 12 мес. наблюдения.

Для статистического анализа использован t-критерий Стьюдента. P-value принимали за $<0,05$. Средние величины результатов исследования представляли в виде M (среднее арифметическое значение) $\pm m$ (стандартная ошибка). При статистической оценке результатов использовано программное обеспечение SPSS для Windows.

Результаты и обсуждение

Характеристика больных до начала исследования представлена в таблице 3.

В исследовании участвовали реципиенты почки от асистолических (доноры третьего типа с запланированной остановкой сердца вследствие прекращения лечения и отключения аппарата искусственной вентиляции легких) и трупных доноров (с диагнозом смерти головного мозга) 58-ми лет с пограничным индексом массы тела (ИМТ) – 25-26 кг/м², и дефицитом витамина Д, определенным как 25(ОН) D < 40 нмоль/л, в среднем 31 нмоль/л, без признаков гиперпаратиреозидизма. Среди причин ХПН у больных можно выделить гломерулонефрит – 27/109 (25 %), поликистоз почек – 14/109 (13 %), диабетическая нефропатия (ДН) – 14/109 (13 %), гипертензивная нефропатия – 14/109 (13 %), хронический интерстициальный нефрит – 13/109 (12 %), другие – 12/109 (11 %) и неизвестные причины – 15/109 (14 %). Все пациенты имели средней ст. тяжести и тяжелую артериальную гипертензию (АГ) – 90 % из них получали антигипертензивную терапию (АГТ) и ИБС с компенсированной ХСН: сохраненной сниженной ФВ, в среднем 42 %; стадии А-С по классификации Американского колледжа кардиологов и Американской ассоциации сердца, I-III ФК (NYHA) со средним риском сердечно-сосудистых катастроф в течение следующих 10 лет по шкале Framingham > 30 %. 10 имели показания для АКШ. Эффект терапии витамином Д после трансплантации подтвержден повышением уровня сывороточного 25(ОН) vitD без признаков нарушений кальциево-минерального витамин Д-связанного обмена.

У 30 % больных после биопсии были зафиксированы случаи отторжения на ранней стадии, которые купировались препаратами ОКТ-3 и АТГ. Через 180 сут., ХНА, выявленная у 89,9 % реципиентов в гр. парикальцитрола и кальцитриола, в сравнении с 95 % и 95 % в гр. диеты и плацебо, соответственно, характеризовалась средней степенью по классификации Banff 1,24 в гр. парикальцитрола и 1,22 в гр. кальцитриола в сравнении с 1,43 и 1,68 в гр. диеты и плацебо, соответственно ($p<0,05$ ДВС) (рисунок 1, а). СКФ непосредственно после трансплантации изменилась со среднего уровня 45,7/ 44,1/ 46,7/ 49,2 до 84,4/ 81,4/ 76,8/ 54,5 мл/ мин/ 1,73м² на 180 сут. в гр. парикальцитрола, кальцитриола, диеты и плацебо, соответственно ($p<0,05$ ДВС) (рисунок 1, с, d). Уровень Кр составлял 1,9 мг/дл в начале исследования, и был подтвержден на уровне 4,1 мг/дл на 180 сут. у реципиентов с плацебо в сравнении с 2,5, 2,5 и 2,8 мг/дл в гр. парикальцитрола, кальцитриола и диеты, соответственно ($p<0,05$ ДВС) (рисунок 1, б). Исследование показало четкий дозозависимый эффект витамина Д в отношении стадии ХНА с учетом негативных эффектов циклоспорина на функцию почек и сердца. Однако, несмотря

Таблица 1

Режимы дозирования витамина Д в гр. исследования

Гр. (n — количество субъектов), форма витамина Д	Дозы (дозировки представлены в мкг и МЕ)				
	Иницирующая доза	Увеличение дозы*	Эскалация назначения	Максимальная доза	Редукция назначения**
Парикальцитол (n=28), капсулы, без специальной диеты под контролем питания	0,06 мкг/ кг (2-4 мкг/сут.)	0,04 мкг/ кг	Каждые 4 нед.	0,24 мкг/ кг	С интервалом в 1 нед.
Кальцитриол (n=28), капсулы, без специальной диеты под контролем питания	1 мкг/сут.	0,08 мкг/ кг	Каждые 4 нед.	6 мкг/сут.	С интервалом в 1 нед.
Диета (n=26), прием витамина Д из пищи (диета) и мультивитаминов в капсулах	1200 МЕ (30 мкг) холекальциферола в сут.	Корректировка диеты на 100-200 МЕ	Каждые 4 нед.	1800 МЕ (45 мкг) холекальциферола в сут.	Постепенная корректировка диеты
Плацебо (n=27), прием плацебо в капсулах и диета	400-600 МЕ (10-15 мкг) холекальциферола в сут.	Корректировка диеты на 100-200 МЕ	Каждые 4 нед.	600-900 МЕ (15-22,5 мкг) холекальциферола в сут.	Постепенная корректировка диеты

Примечание * — при снижении уровня ПТГ менее чем на 50 %, кальция сыворотки менее 11,5 мг/дл. ** — при ПТГ < 100 пг/мл в течение 2-х нед. на курсовом лечении, уровне кальция > 11,5 мг/дл. Иницирующая доза сохраняется в течение периода исследования в случае ПТГ не > 100 пг/мл, уровне кальция < 11,5 мг/дл.

Таблица 2

Олигонуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени

Ген	Forward (по ходу)/ Reverse (в обратном направлении)	Праймер
CD34	Forward	5'-CTATTCCTGATGAATCGCCG-3'
	Reverse	5'-CACACTGGCCTTCCCTGA-3'
CD133	Forward	5'-TGTACGAATTCGACAGCTACTTGGCTCAGAC-3'
	Reverse	5'-CTAGCTCGAGCATGATCTTTATGATAACC-3'
CD73	Forward	5'-CACCAAGGTTTCAGCAGATCCGC-3'
	Reverse	5'-GTTTCATCAATGGGCGACCCGG-3'
CD105	Forward	5'-CATCCTGAAGTCCATGTCCTCTT-3'
	Reverse	5'-GCCAGGTGCCATTTTGCTT-3'

на высокую эффективность высокодозной терапии витамином Д, несомненно, что такая дозировка может представлять угрозу в связи с риском развития гиперкальциемии и связанных с ней осложнений. Аналог витамина Д парикальцитол может быть наиболее оптимальным вариантом назначения витамина Д и активации ЯРВД в связи с минимальным уровнем ожидаемых нежелательных явлений (НЯ) такой терапии.

FACS анализ выявил количественную индукцию циркулирующих и “инкорпорированных” SP⁺ клеток, составляющих 3,4/ 5,7/ 6,2 % прогениторов периферической крови, эпителиальных клеток почки и кардиомиоцитов (КМЦ) с “молодым” или бластным фенотипом до трансплантации, соответственно (средние показатели, p<0,05 ДВС), и 7,4/ 2,9/ 1,2 %, 7,2/ 2,7/ 1,1 %, 6,1/ 2,9/ 1,2 %, 9,3/ 1,3/ 0,7 % на 180 сут. в гр. парикальцитолола, кальцитриола, диеты и плацебо, соответственно (p<0,05 ДВС). Также использовали двойную окраску и повторную сортировку SP⁺ клеток для уточнения CD-фенотипа. Пациенты с приемом парикальцитолола (медиана 161 копия с размахом 0-834), кальцитриола (медиана 163 копий с размахом 0-721) и в гр. диеты (меди-

ана 119; 0-401) имели значительно повышенные уровни CD133, CD34, CD73, CD105 по сравнению с плацебо (медиана 0; 0-41; p<0,01 ДВС). Распределение субпопуляций клеток, включая анализ концентрации мРНК в крови, представлен в таблице 4. Распределение и активность SP⁺ клеток в почечной ткани были значительными только в гр. парикальцитолола и кальцитриола (p<0,01) если сравнивать с другими гр. (p<0,05; таблица 5). Динамика распределения и активности CD34⁺CD133⁺ клеток, связанных своим происхождением с костным мозгом, была близкой по своим параметрам в гр. витамина Д (парикальцитолола и кальцитриола) и диеты (p>0,05), если сравнивать с плацебо (p<0,01). Отсутствовали какие-либо статистически значимые различия между гр. (p>0,05) при анализе распределения CD73⁺CD105⁺ клеток в почечной ткани. Циркулирующие СПК с костномозговым и проэндоthелиальным фенотипом (CD34⁺CD133⁺) оказались более чувствительными к активации ЯРВД по сравнению с СПК, имеющими мезенхимальный фенотип (CD73⁺CD105⁺). При этом известно, что костномозговые клетки с фенотипом CD34⁺CD133⁺CD14⁺CD45⁺CX3CR1⁺ имеют потен-

Таблица 3

Характеристика больных

Характеристика	Парикальцитрол	Кальцитриол	Диета	Плацебо
Кол-во пациентов (n)	28	28	26	27
Возраст, лет	59	58	54	60
Мужчины, %	100	100	100	100
Средняя продолжительность гемодиализа (программный или постоянный амбулаторный перитонеальный) до трансплантации почки, месяцев	12,6	11,8	14,7	15,3
Прием витамина Д в анамнезе из лекарственных средств	0	0	0	0
Асистолические доноры, кол-во (%)	14 (50)	12 (43)	14 (54)	12 (44)
Трупные доноры, n (%)	14 (50)	16 (57)	12 (46)	15 (56)
Гистосовместимость — более чем по 1 антигену, %	100	100	100	100
Нормотермическая реперфузия, n (%)	14 (50)	12 (43)	14 (54)	12 (44)
Холодовая ишемия почки < 24 часов, n (%)	27 (96)	26 (93)	25 (96)	27 (100)
Холодовая ишемия почки — 24-32 часа, N (%)	1 (4)	2 (7)	1 (4)	0 (0)
ИМТ, кг/м ²	27,2	24,1	26,6	25,2
АД, мм рт.ст.	186/102	181/105	176/109	184/108
Кол-во пациентов, получающих АГТ, n (%)	19 (68)	22 (78)	24 (92)	21 (78)
ИБС в анамнезе, n (%):	25 (89)	24 (86)	23 (88)	24 (89)
Пациенты с показаниями для АКШ, n (%)	0 (0)	4 (14)	3 (11)	3 (11)
Больные с ИМ и нестабильной стенокардией в анамнезе, n (%)	5 (18)	4 (14)	3 (11)	4 (15)
Пациенты со стабильной стенокардией, n (%)	20 (71)	16 (57)	17 (65)	17 (63)
ХСН, ФК (NYHA)	2,3	2,3	2,4	2,2
МНУП — brain natriuretic peptide (BNP), пг/мл	551	558	590	512
ФВ, %	44,8	42,3	44,6	41,9
Степень кальцификации КА (по шкале CCS), (размах значений)	602 (0-1283)	595 (0-1600)	613 (95-1398)	701 (0-1750)
Курение, кол-во (%)	19 (68)	16 (57)	18 (69)	15 (56)
Глюкоза, мг/дл	119	123	124	124
Кр, мг/дл	1,9	1,9	2,1	2,2
Холестерин, мг/дл	228	216	222	230
Гемоглобин (до исследования), г/дл	6,1	6,9	8,5	7,1
Гемоглобин (на день 180-й), г/дл	12,8	10,7	12,1	12,2
Эритропоэтин (до исследования), Ед/л	14,5	18,4	14,4	17,2
Эритропоэтин (на день 180-й), Ед/л	26,4	26,2	24,6	29,1
25(ОН) vit D (до исследования), нмоль/л	32,5	31,2	30,3	31,5
25(ОН) vit D (на день 180-й), нмоль/л	68,4	91,4	59,2	49,4
Кальций, ммоль/л:				
Общий	2,2	2,3	2,4	2,4
Скорректированный по альбумину	2,4	2,5	2,5	2,6
Показатель произведения концентрации Ca ²⁺ на концентрацию фосфатов (Ca x P), мг/дл	69	67	72	75
Паратиреоидный гормон, пг/мл	60,5	62,1	63,3	59,1
СКФ до трансплантации, мл/мин/1,73 м ²	16,4	15,2	16,3	16,5
сСКФ до трансплантации, мл/мин	19,8	21,3	20,9	21,8
Стадия ХПН до трансплантации	4,2	4,6	4,4	4,3
СКФ непосредственно после трансплантации, мл/мин/1,73 м ²	46,8	44,1	46,7	49,2
сСКФ непосредственно после трансплантации, мл/мин	52,3	51,3	50,9	51,8
Плотность костной ткани (всего тела) до исследования	1,108	1,114	1,099	1,107
Плотность костной ткани (на день 180-й)	1,144	1,213	1,112	1,121

Примечание: данные представлены как средние арифметические значения без стандартной ошибки в связи с р между гр. >0,05. Чтобы перевести общий холестерин из мг/дл в ммоль/л необходимо указанное значение × на 0,02586. Чтобы перевести глюкозу из мг/дл в ммоль/л необходимо полученные значения × на 0,05551. Чтобы перевести Кр из мг/дл в мкмоль/л необходимо значения × на 88,4.

Таблица 4

Распределение СПК в крови на 180-й день исследования

	Парикальцитол (n=28)	Кальцитриол (n=28)	Диета (n=26)	Плацебо (n=27)	P value
CD133 (мРНК), число копий с размахом значений	112 (0-644)	123 (0-721)	79 (0-401)	10 (0-71)	0,02
CD133 (методом проточной цитометрии), кол-во клеток/мкл	68	79	44	12	<0,01
CD34 (мРНК)	191 (0-734)	189 (0-818)	139 (0-567)	12 (0-86)	<0,01
CD34 (проточная цитометрия)	834	712	532	59	<0,01
CD73 (мРНК)	51 (0-396)	44 (0-310)	31 (0-433)	14 (0-59)	<0,05
CD73 (проточная цитометрия)	131	122	99	17	<0,01
CD105 (мРНК)	39 (0-356)	37 (0-219)	37 (0-398)	6 (0-41)	<0,05
CD105 (проточная цитометрия)	142	145	101	20	<0,01

Примечание: данные представлены как средние арифметические значения без стандартной ошибки с р между гр. <0,05.

Таблица 5

Распределение СПК в почечной ткани

	Тубулярный эпителий	Интерстиций, фибробласты	Эндотелий	Мезангий	Подоциты	Париеальный эпителий
Парикальцитол (n=28)						
CD34+CD133+	3,4 %	10,6 %	5,2 %	2,2 %	1,2 %	0,8 %
CD73+CD105+	2,0 %	8,6 %	1,6 %	3,6 %	1,2 %	0,9 %
Кальцитриол (n=28)						
CD34+CD133+	3,2 %	11,8 %	5,5 %	2,6 %	1,4 %	0,7 %
CD73+CD105+	1,9 %	8,7 %	1,2 %	2,9 %	1,2 %	0,9 %
Диета (n=26)						
CD34+CD133+	1,9 %	9,3 %	3,7 %	0,9 %	2,0 %	0,8 %
CD73+CD105+	1,7 %	6,3 %	0,9 %	1,5 %	1,2 %	0,6 %
Плацебо (n=27)						
CD34+CD133+	1,6 %	4,1 %	1,4 %	0,4 %	0,8 %	0,5 %
CD73+CD105+	0,9 %	3,2 %	0,5 %	1,3 %	1,1 %	0,4 %

Примечание: данные представлены как средние арифметические значения без стандартной ошибки с р между гр. <0,05. Процент распределения клеток представлен относительно общего объема клеточной массы исследуемой ткани (как процент окрашенных клеток в зоне видимости при анализе не менее 10 зон в каждом образце).

циал дифференциации в эндотелиальные, гладкомышечные клетки (ГМК) и КМЦ [32], что является актуальным для больных ХНА. Статистически значимой разницы эффективности между парикальцитолом и кальцитриолом не выявлено ($p > 0,05$).

Следует отметить, что стимуляция СПК привела к перераспределению СПК в пользу клеток интерстиция, фибробластов до 40-50 %; до 60-70 % МСК и тубулярного эпителия до 20 %. Как активная форма витамина Д кальцитриол, так и его аналог парикальцитол не вызвали столь же сильной ответной реакции со стороны мезенхимальных стволовых клеток (МСК), если сравнивать с костномозговыми СПК. В исследовании обнаружено снижение миграции МСК в ткань почки, а значит подавление тубулоинтерстициальной и неоинтимальной инфильтрации ткани [11], что является важным звеном патогенеза ХНА. Вероятным также может быть факт участия МСК в процессе эпителиально-мезенхимальной транзиции, что является основой фиброобразования ткани [1]. Известно, что МСК с фенотипом CD105⁺CD271⁺CD73⁺CD44⁺Stro-

1⁺VCAM-1⁺ICAM-1⁺CD90⁺ имеют потенциал дифференциации в эндотелиальные клетки, ГМК и КМЦ, также как и костномозговые СПК [11,14,16,33]. Отдельного рассмотрения требует аспект происхождения CD14⁺CD34⁺CD45⁻ МСК. Среди наиболее вероятных депо этих клеток рассматриваются периваскулярные ткани, жировая ткань и некоторые органы брюшной полости [10,34]. Действительно МСК выявлялись в первую очередь в периваскулярных тканях и по всей видимости, в большей степени ответственны за процессы сосудистого и периваскулярного ремоделирования [13], в т.ч. перитубулярных и клубочковых капилляров [2]. Таким образом, можно смело утверждать, что МСК вовлечены в патологические процессы трансплантационной васкулопатии и инфильтрацию миофибробластами интерстиция и сосудов почки.

Интерпретация результатов (таблица 6), полученных от SP⁺ клеток требует отдельного рассмотрения. В первую очередь под SP-популяцией, или под сторонней популяцией клеток понимается такая гр. клеток, которая окрашивается витальным

Таблица 6

Распределение и CD-фенотип SP клеток в периферической крови, почечной ткани и миокарде

	Периферическая кровь				Биоптат почки				Миокард УПП			
	Парикальцитрол (n=28)	Кальцитриол (n=28)	Диета (n=26)	Плацебо (n=27)	Парикальцитрол (n=28)	Кальцитриол (n=28)	Диета (n=26)	Плацебо (n=27)	Парикальцитрол (n=28)	Кальцитриол (n=28)	Диета (n=26)	Плацебо (n=27)
SP*	6,4 % (100 %)	7,2 % (100 %)	2,7 % (100 %)	1,1 % (100 %)	6,2 % (100 %)	6,1 % (100 %)	2,9 % (100 %)	1,2 % (100 %)	8,2 % (100 %)	9,3 % (100 %)	1,3 % (100 %)	0,7 % (100 %)
CD34	19,8 %	19,3 %#	20,2 %#	24,5 %	5,2 %	3,5 %	2,4 %#	2,3 %#	6,5 %	9,2 %	7,2 %	2,2 %
CD133	20,5 %	22,6 %	12,3 %#	10,7 %#	16,2 %	15,1 %#	14,1 %#	9,6 %	3,6 %	4,1 %	2,5 %#	1,6 %#
CD105	28,8 %	36,8 %	31,7 %	25,5 %	42,2 %	48,4 %	32,6 %	24,8 %	29,2 %	40,6 %	28,4 %	21,3 %
CD73	18,9 %	19,8 %	17,5 %	13,8 %	28,4 %	29,6 %	21,5 %#	19,9 %#	20,1 %	22,7 %	12,1 %	9,9 %
CD31	90,4 %	89,9 %#	91,3 %#	75,2 %	16,2 %	15,4 %#	13,6 %#	10,2 %	18,4 %	22,2 %#	19,1 %#	11,4 %
Sca1	68,6 %	73,8 %#	71,2 %#	66,4 %	78,6 %	79,5 %	74,1 %#	72,2 %#	62,8 %	73,5 %	69,5 %#	70,5 %#
CD24	82,8 %	84,4 %#	90,2 %	84,6 %#	80,1 %	82,3 %	78,2 %	69,4 %	70,3 %	77,6 %	65,3 %	52,7 %
CD29	94,4 %	98,3 %	82,1 %#	81,8 %#	95,3 %	97,9 %#	96,3 %#	97,1 %#	58,6 %	59,4 %	64,5 %	66,1 %
CD90	29,5 %	32,6 %	26,6 %#	25,7 %#	38,7 %	40,6 %	23,2 %	12,4 %	18,4 %	20,4 %	16,3 %	10,1 %
CD105	76,4 %	78,6 %	73,7 %	66,4 %	76,5 %	80,6 %#	80,4 %#	74,2 %	80,4 %	82,2 %	86,8 %#	87,1 %#
c-kit	82,6 %	86,6 %	82,2 %#	83,8 %#	NA	0,4 %#	0,4 %#	0,2 %	1,4 %	1,6 %	1,0 %#	1,0 %#
Lin	NA	NA	NA	NA	NA	1,8 %	1,5 %	1,0 %	1,0 %	1,0 %	0,8 %#	0,8 %#
CD44	96,4 %	98,2 %	96,8 %#	96,9 %#	70,4 %	71,6 %#	69,4 %#	66,2 %	1,2 %	1,1 %	0,5 %	0,3 %
CD45	98,9 %	98,4 %#	97,3 %#	95,2 %	3,6 %	4,2 %	2,4 %	1,5 %	4,0 %	4,2 %	3,2 %#	3,0 %#
Mac-1	NA	3,1 %	3,5 %	5,2 %	8,0 %	8,8 %	7,3 %	2,2 %	4,1 %	4,3 %	2,7 %	2,6 %
CD14	NA	NA	NA	NA	4,1 %	4,2 %	2,1 %	1,1 %	NA	NA	NA	NA
Pax2	NA	NA	NA	NA	56,4 %	62,9 %	55,6 %	59,4 %	NA	NA	NA	NA
ABCG2 (BCRP1)	90,6 %	98,2 %	92,6 %#	94,5 %#	96,6 %	96,2 %#	96,0 %#	94,6 %	96,2 %	95,7 %#	96,1 %#	92,3 %

Примечание: данные представлены как средние арифметические значения без стандартной ошибки с p между гр. <0,05 (*p>0,05).

Процент распределения клеток с различным CD-фенотипом представлен относительно общего объема предварительно FACS-отсортированной массы SP-положительных клеток исследуемой ткани, принятой за 100 %. * — процент выявленных SP-клеток представлен относительно общего объема клеточной массы исследуемой ткани. NA — данные не доступны по техническим причинам.

красителем Hoechst 33342, используемым в процедурах FACS, который флуорисцирует в сине-красном спектре [35]. Эксперименты с верапамилом показали чувствительность этой популяции клеток, выявляемой как среди зрелых клеток, так и СПК, к состоянию АВС-транспортеров (АТФ-зависимых кассетных транспортеров) и в частности к экспрессии транспортера ABCG2 [35]. Следует отметить, что SP-клетки — это гетерогенная популяция и в большинстве случаев являются прогениторами, однако размер, происхождение, фенотип и потенциал этих клеток является наиболее спорным вопросом репаративной медицины. SP-клетки, несомненно, способны формировать ниши в тканях почки (большой частью, в проксимальных отделах нефрона) и миокарда (значительно в периваскулярных пространствах), поддерживая процессы репарации органа в течение длительного времени, в т.ч. за счет относительно высокой пролиферативной активности и мультипотентности. Известно, что SP⁺ клетки с фенотипом CD14⁺CD105⁺CD45⁺CD34⁻ имеют потенциал дифференциации исключительно в ГМК и клетки с мезенхимальным фенотипом [33,35].

При анализе таблицы 6 особого внимания требует факт экспрессии SP-клетками антигенов характерных для резидентных СПК миокарда. В частности, Marban E. (2010) [9-16, 9,33,35] указывает, что для резидентных СПК миокарда характерен фенотип CD90⁺CD105⁺c-kit⁺CD34⁻CD45⁻MDR1⁻ABCG2⁻CD133⁻lin⁻CD31⁻. Большинство (до 94 %) CD31⁻BCRP1⁺ СПК выявляются в периваскулярных пространствах миокарда (большой частью, зрелые клетки) и не более 5-6 % (с мезенхимальным фенотипом) — в интерстициальном пространстве. Специфического распределения СПК в разных отделах миокарда в более ранних исследованиях не отмечено. Известно, что кардиальные резидентные SP⁺ СПК способны дифференцироваться в КМЦ (4,4 %), клетки эндотелия (6,7 %) и ГМК (29 %). Настоящее исследование подтвердило известные данные о фенотипе и распределении сторонней популяции СПК как в миокарде, так и почке. Наибольшее внимания требует чувствительность данной категории клеток к активации ЯРВД. Наиболее распространенными антигенами среди миокардиальных SP⁺ СПК оказались CD31^{low}, CD90^{low}, sca-1, CD29 и CD105. Данный фенотип

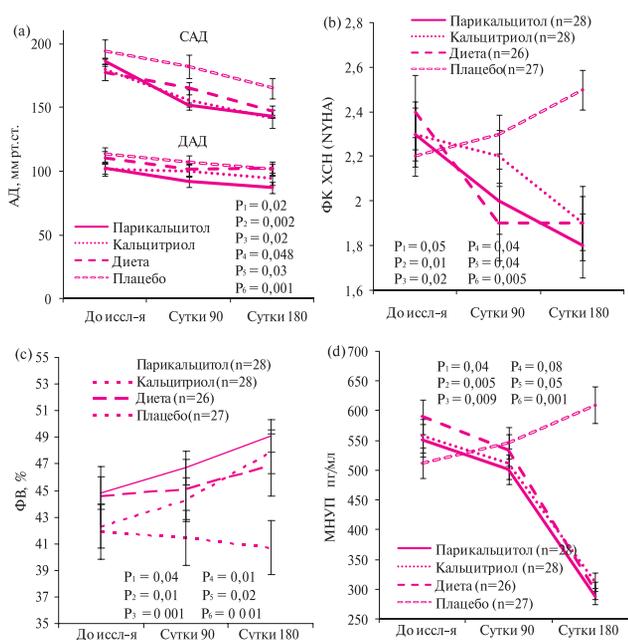
указывает на более мезенхимальное происхождение, свойства и репаративный потенциал данных клеток. Наиболее чувствительными — 1,5-2-х кратное изменение доли клеток ($p < 0,05$) к терапии парикальцитолом и кальцитриолом оказались клетки, имеющие явное костномозговое происхождение или характерные для эндотелия и макрофагов, такие как CD34, CD31, CD90, CD45. Подобная динамика наблюдалась в периферической крови, однако для крови более характерными оказались такие антигены как CD34^{low}, CD31, CD24, sca-1, c-kit, CD44, CD45. При анализе данных о фенотипе и распределении сторонней популяции клеток в почках, следует напомнить, что CD133⁺ клетки (до 0,8-1,2 %) в почке способны дифференцироваться в клетки эндотелия и эпителия [12]. Несомненно, что потенциальную нишу СПК следует искать в наиболее поверхностных слоях коркового вещества, а также сосочках почки. Интересным представляется потенциальная возможность существования “паратубулярной” ниши, физиологически связанной с естественной “неотложной” или точнее “экстренной” регенерацией и репарацией тубулярного эпителия. Наиболее распространенными антигенами SP⁺ СПК по результатам исследования являются CD24, CD29, CD44, CD133^{low}, CD105^{low}, CD31^{low}, sca-1, рах2. Наиболее чувствительными к активации ЯРВД оказались клетки с фенотипом CD133, CD24, CD44, мас-1, CD45, CD14, что указывает на наибольшую чувствительность клеток костномозгового происхождения, с мезенхимальным фенотипом, а также макрофагов и эндотелия.

Экспрессия ЯРВД выявлена в цитоплазме (вероятно митохондриальные, микросомальные и липосомальные фракции) и на цитоплазматической мембране в клубочках и проксимальных канальцах почек без признаков наличия ЯРВД на мембране ядра клеток. Однако в дистальных канальцах и собирательных трубочках ЯРВД экспрессировался исключительно на ядерных мембранах с незначительной цитоплазматической фракцией. Данное распределение рецептора окрашивающегося как ЯРВД не совпадает с находками у животных, таких как лабораторные мыши [24]. У мышей ЯРВД выявляется на ядерных мембранах с цитоплазматической фракцией во всех отделах нефрона. Можно предположить, что данные видовые различия связаны с попыткой природы сделать наиболее важные проксимальные отделы нефрона не чувствительными к медленным геномным эффектам витамина Д, а значит более защищенными. В то же время в этих наиболее метаболически активных отделах нефрона реализуются быстрые негеномные эффекты витамина Д через цитоплазматический ЯРВД, направленные на обеспечение неотложной помощи клеткам в борьбе с воспалением, окислительным стрессом и т. п. [19]. В ткани УПП отмечали экспрессию ЯРВД преимущественно на ядерной мембране

с фракцией в цитоплазме КМЦ по всей видимости, в композиции с т-трубочками и другими органеллами, в первую очередь вовлеченными в сократительную деятельность, включая митохондрии) и на цитоплазматической мембране, что подчеркивает роль витамина Д в сократительной активности миокарда. Уровень протеина ЯРВД в гомогенизате почечной ткани после рутинной биопсии и миокарде после анализа ткани УПП у АКШ-пациентов достигал 584/ 599/ 478/ 333 фмоль ЯРВД/мг и 801/ 715/ 654/ 389 фмоль ЯРВД/мг протеина в гр. парикальцитолола, кальцитриолола, диеты и плацебо, соответственно ($p < 0,01$ ДВС) на 180 сут. исследования. Циркулирующие СПК продемонстрировали сравнительно высокий уровень экспрессии ЯРВД на уровне 529/ 526/ 401/ 211 фмоль ЯРВД/мг протеина в CD133⁺CD34⁺ клетках (с костномозговым фенотипом), 432/ 414/ 303/ 290 фмоль ЯРВД/мг в CD73⁺CD105⁺ (с мезенхимальным фенотипом) клетках, и 549/ 558/ 442/ 302 фмоль ЯРВД/мг в SP⁺ клетках (с различным фенотипом и репаративным потенциалом) в гр. парикальцитолола, кальцитриолола, диеты и плацебо, соответственно ($p < 0,05$ ДВС).

ГКПС как одно из наиболее важных осложнений приема витамина Д у больных ХНА выявлено только у 4/28 (14 %) пациентов в гр. кальцитриолола ($p < 0,001$ ДВС) без каких-либо побочных эффектов (ПЭ) тяжелой степени и признаков гиперкальциемии в других гр. Среди клинических проявлений ГКПС в гр. витамина Д можно указать общую усталость ($n=4/28$, 14 %), анорексию ($n=4/28$, 14 %), тошноту ($n=2/28$, 7 %), нарушения ритма сердца ($n=2/28$, 7 %), запор ($n=2/28$, 7 %), психиатрические симптомы депрессии ($n=2/28$, 7 %). Несомненно, что наличие даже нескольких случаев гиперкальциемии у больных, принимавших кальцитриол в дозе до 3600 МЕ, является серьезной проблемой для использования относительно высоких доз витамина Д в кардиологии и у больных ХПН или ХНА. Каким-либо лекарственных НЯ или серьезных НЯ у больных, принимавших парикальцитол, не отмечено, что делает это лекарственное средство весьма привлекательным инструментом в комплексной терапии ХНА и КРС.

Клиника КРС у больных была представлена редуцированием СКФ и прогрессией ХНА в комбинации с меняющимися параметрами физиологии сердца. Под влиянием АГТ АД снизилось после трансплантации со 186/102, 180/101, 177/110, 194/113 мм рт.ст. до 143/87, 141/94, 147/102, и 165/101 мм рт.ст. в гр. парикальцитолола, кальцитриолола, диеты и плацебо, соответственно ($p < 0,01$) с более значительным эффектом в гр. с использованием лекарственного витамина Д (рисунок 2, а). ФК ХСН (НУНА) (рисунок 2, б) изменился с 2,3/ 2,3/ 2,4/ 2,2 до 1,8/ 1,9/ 1,9/ 2,5 ($p < 0,01$ для сравнений между гр. лекарственного витамина Д и диеты) в гр., соответственно. Однако статистическая разница в эффекте витамина Д между гр.



Примечание: P_1 – р для разницы между гр. кальцитриола и диеты. P_2 – р для разницы между гр. кальцитриола и плацебо. P_3 – р для разницы между гр. диеты и плацебо. P_4 – р для разницы между гр. парикальцитрола и кальцитриола. P_5 – р для разницы между гр. парикальцитрола и диеты. P_6 – р для разницы между гр. парикальцитрола и плацебо.

Рис. 2 Динамика (а) АД, (б) ФК ХСН (NYHA), (с) ФВ, и (д) МНУП на 180-й день после трансплантации почки.

лекарственного витамина Д и диеты была незначительной, что подчеркивает значение как активной формы витамина Д кальцитриола, так и его аналога парикальцитрола для лечения ХСН, а также определенные преимущества приема аналогов витамина Д и поступления этого витамина с продуктами питания и мультивитаминами для нужд кардиологии с минимальным риском эндокринных осложнений. ХСН была охарактеризована также динамикой ФВ и МНУП (рисунок 2, с, д). Кривые ФВ и МНУП подтвердили наличие позитивных эффектов терапии витамином Д и диеты в сравнении с плацебо, но также без значительной статистической разницы значений между гр. лекарственного витамина Д и диеты. Однако ЯРВД непосредственно связан с промотором гена предсердного НУП (ПНУП), что означает очевидный эффект активации ЯРВД на уровень НУП. В исследовании снижении этого пептида демонстрирует не только эффекты на стадию ХСН, но и на ст. ХНА. Неоспоримым является факт, что витамин Д эффективен в лечении ХСН и АГ. Известно, что ЯРВД непосредственно связан с сократительным аппаратом КМЦ, обеспечивая сохранение контрактильной функции клеток и миокарда в целом [8,30], что подтверждает динамика ФВ. Очевиден эффект витамина Д на ренин-ангиотензин-альдостероновую систему (РААС), а также вазодилатацию, что способствует снижению АД и защите миокарда от прогрессирования ХСН. Из экспериментальных исследований

известно также, что витамин Д способен модулировать сократимость КМЦ *in vitro* за счет изменения распределения цепей миозина и путем моделирования поступления кальция в КМЦ. Витамин Д также модулирует рост, гипертрофию, отложение коллагена, и дифференциацию КМЦ, обеспечивая ключевую роль активации ЯРВД в физиологии сердца [6]. Настоящее исследование впервые продемонстрировало эффект витамина Д, как кальцитриола и парикальцитрола, так и специальной диеты, у больных с КРС, т. е. эффективность в лечении ХНА и ХСН, отягощенных длительной иммуносупрессивной терапией, воспалением и т. п. При сравнительном анализе динамики АД выяснилось, что витамин Д обладает собственным эффектом, снижая САД не менее чем на 8 %.

Степень кальцификации КА по шкале CCS достигала 602/ 595/ 613/ 701 в начале исследования (таблица 2) в гр. парикальцитрола, кальцитриола, диеты и плацебо, соответственно. 21 % больных имели $CCS = 0$, и 73 % пациентов имели $CCS > 401$. Через 6 мес. после трансплантации средний балл по шкале CCS составлял 533 (с размахом 0-998)/ 611 (0-1712)/ 524 (122-1278)/ 990 (120-1800) в гр., соответственно ($p < 0,05$ ДВС). Отсутствие изменений CCS было констатировано через 6 мес. после трансплантации в гр. кальцитриола и плацебо; у 75 % больных CCS была без изменений, и более высокий уровень CCS. Однако в гр. парикальцитрола и диеты было отмечено статистически значимое изменение CCS ($p < 0,05$). Как известно, интимальная и медиальная кальцификация сосудов характерна для диализных больных. Кальцификация — активный процесс, обусловленный активностью клеток, таких как ГМК или МСК с их трансдифференциацией в остеобластоподобные клетки, однако пассивная депозиция кальция и фосфатов может также иметь место [36]. Наше исследование подтвердило наличие четкой корреляции между уровнем витамина Д и кальцификацией сосудов, а также увеличением количества СПК, что подчеркивает роль СПК в процессах кальцификации сосудов и бляшек (АБ).

9 больных ($n=9/109$, 8 %) умерло в течение однолетнего наблюдения, но строго в период с 7 по 11 мес. после трансплантации почки. 5 случаев смерти ($n=5/27$, 19 %) в гр. плацебо квалифицированы как случаи осложненного острого инфаркта миокарда (ОИМ) с подъемом сегмента ST. Один случай ОИМ ($n=1/28$, 4 %) был зарегистрирован в гр. кальцитриола, однако *postmortem* не смогли установить причину острого некроза миокарда (все артерии были без значимых признаков атеротромбоза с небольшими АБ, закрывающими просвет на < 25 % без признаков повреждения покрышек АБ). Источник возможной интоксикации не определен, также как и вероятность передозировки витамином Д. 3 случая смерти по причине инсульта были зарегистрированы в гр. диеты ($n=1/26$, 4 %)

и плацебо (n=2/27, 7 %). Во всех случаях смерти аллографт имел признаки ХНА средней ст. выраженности и клинически пациенты не имели признаков прогрессирования ХНА или острого отторжения графта. В гр. парикальцитола случаев смерти не зарегистрировано.

Заключение

Парикальцитол и кальцитриол в сопоставимых дозах обладают сравнимой эффективностью в лечении КРС и ХНА, однако в связи с высоким риском гиперкальциемических и гиперфосфатемических осложнений при приеме кальцитриола, парикальцитол имеет объективные преимущества в реальной клинической практике трансплантолога, нефролога или кардиолога.

Потребление витамина Д с мультивитаминами или продуктами питания принципиально имеет достаточно высокий уровень эффективности для профилактики и лечения КРС, ХНА, защиты и репарации тканей почки и миокарда. Витамин Д в лекарственной форме и в виде мультивитаминных или продуктов питания может позволить редуцировать прогрессирование КРС и ХНА в среднем на 38 %, будучи вовлеченным в различные патофизиологические каскады, включая воспаление, фиброз и репаративные механизмы, обеспечивающие функциональную и структурную сохранность почки и миокарда. Стимулированное увеличение экспрессии ЯРВД в клубочке и проксимальных отделах нефрона ведет к запуску быстрых негеномных механизмов без вовлечения ядра клетки, реализующихся в многоуровневой защите наиболее важной части нефрона с функциональной точки зрения, предотвращению воспаления, фиброза, апоптоза и стимуляции естественной регенерации и репарации органа. Нарастающая экспрессия ЯРВД в дистальных отделах нефрона ведет к реализации “медленных” геномных эффектов, поддерживающих репарацию и функциональную активность канальцев, а также регулирующих активность резидентных и “инкорпорированных” СПК.

Парикальцитол и кальцитриол в состоянии стимулировать рекрутинг и активность СПК различного происхождения (SP⁺ клетки и клетки костномозгового происхождения) с эффектами на различных уровнях естественной регенерации и репарации органа. До 67,9 % СПК обнаруживают среди интерстиция и фибробластоподобных клеток, и лишь 32 % — среди тубулярного эпителия. Данный компартмент почки следует считать своеобразной “нишей” для резидентных и “инкорпорированных”, в т.ч. циркулирующих СПК у человека. Предсердные и верхушечные сегменты миокарда также можно рассматривать как основную “нишу” СПК, экспрессирующих ЯРВД. Основными регуляторами репарации почки и миокарда необходимо признать СПК с костномозговым фенотипом, которые,

паракринным и аутокринным путями, управляют различными процессами репарации и регенерации на разных уровнях.

Особого внимания требуют SP⁺ клетки, среди которых есть как зрелые, так и СПК со следующими наиболее характерными антигенами CD24, CD29, CD44, CD133, CD105, CD31, sca-1 и рax2. Эта сторонняя популяция клеток представляет собой наиболее метаболически и функционально активную фракцию клеток, ответственных за репарацию органа и могут являться потенциальной мишенью для терапевтического вмешательства с использованием фармакологических средств, цитокинов и факторов роста, с учетом высокой чувствительности данной категории клеток к активации ЯРВД. При использовании парикальцитола и кальцитриола отмечается двукратное увеличение SP⁺ клеток с костномозговым и мезенхимальным фенотипом, а также антигенами макрофагов и эндотелия, что свидетельствует о перераспределении СПК и активации процессов репарации ткани.

Витамин Д не подтвердил своей эффективности как инструмент для фармакологического управления МСК человека, однако проведенный анализ показал влияние витамина Д на некоторые процессы и функциональные свойства МСК, в частности процессы миграции МСК в ткань почки и миокарда, что подчеркивает необходимость проведения новых экспериментальных исследований с учетом мультифакториального влияния на СПК человека после трансплантации почки, принимая во внимание иммуносупрессивный и костномозговой эффекты циклоспорина. Витамин Д и активация ЯРВД подавляют тубулоинтерстициальную и неоинтимальную миграцию МСК в ткани почки, предотвращая явления ТИФ и ПТАС. Аспекты иерархической регуляции деятельности МСК в ткани почки и миокарда выяснить не удалось. Однако несомненным является факт “прекоммитированности” МСК в пользу фибробластоподобного фенотипа клеток, что может представлять серьезное препятствие для использования МСК как метода лечения ХПН или ХНА в связи с угрозой потенцирования процессов фиброобразования ткани.

Наиболее оптимальными схемами использования витамина Д у больных ХНА и КРС следует считать прием парикальцитола в дозе 2-4 мкг/сут. и поступление витамина Д с продуктами питания или мультивитаминами с оптимальной дозой не более 1800 МЕ/сут. и ограничением инсоляции таких пациентов из-за повышенного риска меланомы на фоне иммуносупрессивной терапии. Высокодозная (до 6 мкг/сут.) лекарственная терапия витамином Д животного происхождения — кальцитриолом — показала высокую эффективность и низкую безопасность, связанную со значительным уровнем осложнений из-за нарушений минерального обмена.

Витамин Д, и в частности, парикальцитрол и кальцитриол, имеет большое количество так называемых “плейотропных” системных и местных эффектов в рамках кардиоренальной патофизиологической оси у пациентов после трансплантации почки, обеспечивая защиту, как почек, так и сердца у таких больных. Витамин Д требует повышенного внимания, как агент для профилактики и лечения КРС у больных ХНА в связи со способностью улуч-

шать сократительную способность миокарда (способствовал увеличению ФВ в среднем на 11,7 %) путем прямого влияния на сократительный аппарат КМЦ и редуцировать ФК ХСН в среднем на 17,4 %, не считая хороший собственный антигипертензивный эффект с нормализацией АД в среднем с поправкой на фоновую терапию — на 8,3 %, без статистически значимого влияния на ДАД, связанным в т.ч. с регуляцией на уровне РААС.

Литература

1. Bedi S, Vidyasagar A, Djamali A, et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Chronic Allograft Tubulointerstitial Fibrosis. *Transplant Rev* 2008; 22: 1-5.
2. Cornell LD, Colvin RB. Chronic allograft nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14: 229-34.
3. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, et al. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326-33.
4. Reinglas J, Haddad H, Davies RA, Mielinczuk L. Cardiorenal syndrome and heart failure. *Current opinion in cardiology* 2010; 25: 141-7.
5. Ronco C, Haapio M, House AA, et al. Cardiorenal syndrome. *JACC* 2008; 52(19): 1527-39.
6. Artaza JN, Mehrotra R, Norris KC. Vitamin D and the cardiovascular system. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(9): 1515-22.
7. Menon V, Gul A, Sarnak MJ. Cardiovascular risk factors in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005; 68: 1413-8.
8. Ojo AO. Cardiovascular complications after renal transplantation and their prevention. *Transplantation* 2006; 5: 603-11.
9. Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest* 2005; 115: 1743-55.
10. Rienstra H, Boersema M, Onuta G, et al. Donor and recipient origin of mesenchymal and endothelial cells in chronic renal allograft remodeling. *Am J Transplant* 2009; 9: 463-72.
11. Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE, et al. Mesenchymal stromal cells: a novel treatment modality for tissue repair. *Hematopoietic Stem Cells VII. Ann N Y Acad Sci* 2009; 1176: 101-17.
12. Bussolati B, Bruno S, Grange C, et al. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol* 2005; 166: 545-55.
13. Hillebrands JL, Onuta G, Rozing J, et al. Role of progenitor cells in transplant arteriosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15: 1-8.
14. Iwatani H, Imai E. Kidney repair using stem cells: myth or reality as a therapeutic option? *J Nephrol* 2010; 23(02): 143-6.
15. Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, et al. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest* 2004; 114: 795-804.
16. Reinders ME, Fibbe WE, Rabelink TJ, et al. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 17-24.
17. Li M, Batuman V. Vitamin D: a new hope for chronic kidney disease? *Kidney Int* 2009; 76: 1219-21.
18. Marcen R, Ponte B, Rodriguez-Mendiola N, et al. Vitamin D deficiency in kidney transplant recipients: risk factors and effects of vitamin D3 supplements. *Transplant Proceed* 2009; 41: 2388-90.
19. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 491S-9.
20. Wu-Wong JR. Vitamin D receptor: a highly versatile nuclear receptor. *Kidney Int* 2007; 72: 237-9.
21. Ewers B, Gasbjerg A, Moelgaard C, et al. Vitamin D status in kidney transplant patients: need for intensified routine supplementation. *Am J Clin Nutr* 2008; 87(2): 431-7.
22. Valdivieso JM, Cannata-Andia J, Coll B, Fernandez E. A new role for vitamin D receptor activation in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297: F1502-9.
23. Kazantzidis A, Bais AF, Zempila MM, et al. Calculations of the human vitamin D exposure from UV spectral measurements at three European stations. *Photochem Photobiol Sci* 2009; 8: 45-51.
24. Adorini L, Amuchastegui S, Daniel KC, et al. Prevention of chronic allograft rejection by vitamin D receptor agonists. *Immunol Lett* 2005; 100: 34-41.
25. Sprague SM, Llach F, Amdahl M, et al. Paricalcitol versus calcitriol in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Kidney International* 2003; 63: 1483-90.
26. Seeherunvong W, Nwobi O, Abitbol CL, et al. Paricalcitol versus calcitriol treatment for hyperparathyroidism in pediatric hemodialysis patients. *Pediatr Nephrol* 2006; 21: 1434-9.
27. Tan X, He W, Liu Y. Combination therapy with paricalcitol and trandolapril reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney International* 2009; 76: 1248-57.
28. Druke TB, McCarron DA. Paricalcitol as Compared with Calcitriol in Patients Undergoing Hemodialysis. *N Engl J Med* 2003; 349(5): 496-9.
29. Teng M, Wolf M, Lowrie E, et al. Survival of Patients Undergoing Hemodialysis with Paricalcitol or Calcitriol Therapy. *N Engl J Med* 2003; 349: 446-56.
30. Tishkoff DX, Nibelink KA, Holmberg KH, et al. Functional vitamin D receptor (VDR) in the t-tubules of cardiac myocytes: VDR knockout cardiomyocyte contractility. *Endocrinology* 2008; 149(2): 558-64.
31. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff'07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8: 753-60.
32. Lin F, Moran A, Igarashi P, et al. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. *J Clin Invest* 2005; 115: 1756-64.
33. Kale S, Karihaloo A, Clark PR, et al. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest* 2003; 112: 42-9.
34. Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, et al. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 2001; 345: 93-7.
35. Huls M, Russel FG, Masereeuw R. The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 328: 3-9.
36. Bubenicek P, Kautznerova D, Sotornik I, et al. Coronary calcium score in renal transplant recipients. *Nephron Clin Pract* 2009; 112(1): 1-8.

Поступила 30/08-2010