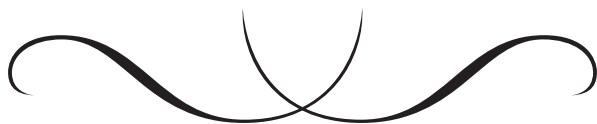


**Медицински университет
„Проф. д-р П. Стоянов”
Варна**

Факултет по медицина

Катедра по физиология и патофизиология



Д-р ЛЮБКА ЮРИЕВА ДЕЧЕВА - ИКОНОМОВА

**Проучване на регулаторните ефекти
на аналози на витамин D върху
калциево-фосфорната обмяна
при заместване на бъбречната
функция**

Автореферат
на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен
„Доктор”



Варна
2014

**Медицински университет
„Проф. д-р П. Стоянов” - Варна**

Катедра по физиология и патофизиология

Д-р Любка Юриева Дечева - Икономова

**Проучване на регулаторните ефекти на
аналози на витамин D върху калциево-
фосфорната обмяна при заместване на
бъбречната функция**

Автореферат
на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен
„Доктор”

Специалност “Физиология на животните и човека”

Научни ръководители
Доц. д-р Златислав Стоянов, д.м.н.
Доц. д-р Добрин Паскалев, д.м.

Рецензенти
Проф. д-р Радослав Гърчев, д.м.н.
Проф. д-р Васил Тодоров, д.м.н.

Варна, 2014

Дисертационният труд съдържа 180 стандартни страници, 41 фигури и 28 таблици. Библиографията включва 266 литературни източника, 11 на кирилица и 255 на латиница, като 142 (53,45%) от тях са от последните пет години.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедрата по физиология и патофизиология, Медицински университет – Варна.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на2014г. отч. в III аудитория, Медицински университет – Варна, на открито заседание на Научното жури. Материалите по защитата са на разположение в Библиотеката на Медицински университет – Варна.

Използвани съкращения

ОБУ	Остро бъбречно увреждане
ПТХ	Паратиреоиден хормон
ХБЗ	Хронично бъбречно заболяване
ХД	Хемодиализа
ХДФ	Хемодиафилтрация
ХФ	Хемофилтрация
CaSR	Ca ²⁺ -сензитивен рецептор
CLDN16	Клаудин 16
CRP	С-реактивен протеин
FGF23	Фибробластен растежен фактор 23
FGF7	Фибробластен растежен фактор 7
High flux мембрани	Високоэффективни мембрани
IL	Интерлевкин
Low flux мембрани	Нискоэффективни мембрани
LRP5 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5)	Протеин 5 отнасящ се към рецепторите на нископлътните липопротеини
PGE	Простагландин Е
PTHrP	Свързан с паратиреоидния хормон пептид
ROMK	Коригиращи канали за K ⁺
sFRP4	Секретиран накъдрен протеин 4
TNF α	Тумор некрозис фактор алфа
TRPV6	Калциев канал
VDR	Рецептор на витамин D

СЪДЪРЖАНИЕ

1. Въведение	7
2. Цел.....	8
3. Задачи	8
4. Материал и методи.....	9
4.1. Изследвани лица.....	9
4.2. Прилагани аналози на витамин D.....	12
4.3. Изследвани показатели	14
4.4. Лабораторни методи.....	15
4.5. Статистическа обработка.....	15
5. Резултати.....	17
5.1. Калций	18
5.2. Фосфор	22
5.3. Алкална фосфатаза.....	26
5.4. Паратхормон	31
5.5. С-реактивен протеин.....	32
5.6. Бета ₂ -микроглобулин.....	34
6. Обсъждане	36
6.1. Калций	36
6.2. Фосфор	40
6.3. Алкална фосфатаза.....	43
6.4. ПТХ.....	46
6.5. С-реактивен протеин.....	49
6.6. Бета ₂ -микроглобулин.....	52
7. Основни изводи	55
8. Обобщение.....	56
9. Справка за основните приноси на дисертационния труд...57	
Декларация	59
Публикации свързани с темата:	60

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Калциево-фосфорната обмяна има значима роля при поддържането на хомеостазата в човешкия организъм, както и на интегритета и функционалната годност на опорно-двигателния апарат. Нарушенията водят до тежки отклонения в регулацията на мускулните съкращения, в основните функции на отделителната система и в обменните процеси в костната система. Хормоналните отклонения свързани с калциево-фосфорната обмяна имат и допълнителни плейотропни ефекти върху други органи и системи.

Обект на настоящия дисертационен труд са проявите на нарушената регулация на калциево-фосфорната обмяна. Изясняват се причините и физиологичните защитни механизми при хипер- и хипокалциемия, при хипо- и хиперфосфатемия, както и ролята на ендокринната система и бъбреците в тези процеси. Проучват се регулаторните ефекти на витамин D-аналозите върху обмяната на калция и на фосфора. Подбран е стабилен модел на липсваща или negliжируемо ниска синтеза на витамин D. Затова проучването е проведено при лица с 5-ти стадий на хронично бъбречно заболяване, което изисква заместване на бъбречната функция. От различните възможности за заместителна терапия са изследвани само лица на хемодиализно лечение, които са преминали адаптационния период на лечението.

Цел на проучването е да се проследят динамичните промени в подбрани параметри на калциево-фосфорната обмяна, за да се проучат регулаторните ефекти на различни витамин D-аналози при репродуцируем модел със заместителна терапия на бъбречната функция.

2. ЦЕЛ

Цел на изследването е да се проучат регулаторните ефекти на аналози на витамин D върху калциево-фосфорната обмяна при заместване на бъбречната функция в стадий 5 на хроничното бъбречно заболяване.

3. ЗАДАЧИ

3.1. Да се изследва динамиката в стойностите на калций, фосфор, алкална фосфатаза, паратхормон под въздействие на алфакалцидол при заместителна терапия на бъбречната функция.

3.2. Да се изследва динамиката в нивата на калций, фосфор, алкална фосфатаза, паратхормон под въздействие на калцитриол при заместителна терапия на бъбречната функция.

3.3. Да се изследва динамиката в нивата на калций, фосфор, алкална фосфатаза без прилагане на аналози на витамин D при заместване на бъбречната функция в стадий 5 на хроничното бъбречно заболяване.

3.4. Да се проучи динамиката на С-реактивен протеин и на бета2-микроглобулин под въздействие на алфакалцидол и калцитриол при заместителна терапия на бъбречната функция.

4. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

4.1. Изследвани лица

Проучването обхваща 186 лица в 5-ти стадий на хронично бъбречно заболяване, с отпадане на бъбречната функция, което налага заместването ѝ. (Таблица 1).

Таблица 1. Стадии на хроничното бъбречно заболяване

Стадий	Гломерулна филтрация ml/min	Характеристика
1. Нормална гломерулна филтрация	90 и по-висока	Нормална бъбречна функция, положителни тестове за ранни признаци на бъбречно увреждане
2. Лека степен на ХБЗ	60 - 89	Леко намалена бъбречна функция, положителни тестове за бъбречно увреждане
3. Умерена степен на ХБЗ	30 - 59	Умерено намалена бъбречна функция
4. Значителна степен на ХБЗ	15 - 29	Значително намалена бъбречна функция
5. Крайна степен на ХБЗ	< 15 Заместителна терапия на бъбречната функция	Тежко увредена бъбречна функция. Обсъжда се заместителна терапия на бъбречната функция с диализа или бъбречна трансплантация за поддържане на живота

Бъбречната функция е увредена поради различни причини като хипертензивна нефропатия в резултат на хипертонична болест, хроничен гломерулонефрит, хроничен пиелонефрит, бъбречна поликистоза или други неизвестни причини. Всички изследвани са започнали заместителна

терапия на бъбречната функция с хронично хемодиализно лечение от най-малко 4 месеца. В проучването не са включени пациенти с диабет, с данни за малнутриция, с чернодробна недостатъчност, с калциево-фосфорен продукт над $4,44 \text{ mmol}^2/\text{l}^2$, с данни за бъбречно-свързана амилоидоза. От проучването са изключени лицата с хиперкалциемия и с непоносимост към аналозите на витамин D. Обхванатите лица са с нормални плазмените нива на общия белтък и албумина. Имат анамнестични, клинични и лабораторни данни за бъбречна остео дистрофия. Три месеца преди проследяването не са приемали деривати на витамин D. При хемодиализното лечение са използвани само low flux диализни мембрани.

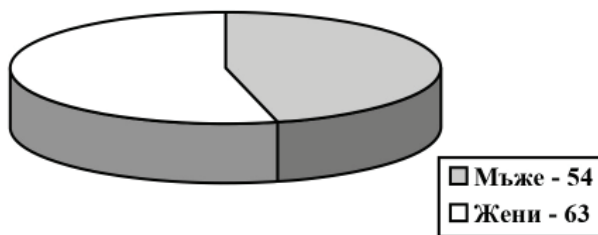
Изследваните лица са разпределени рандомизирано в три групи: първа група – третирани с алфакалцидол; втора група – третирани с калцитриол; трета група – контролна без аналози на витамин D. Проучването е проведено в продължение на 5 месеца.

Всички изследвани са включени в редовно планово хемодиализно лечение, стандартно 3 процедури на седмица, с продължителност на отделната диализна процедура средно 4 часа. Хемодиализата при всички лица е с бикарбонатни разтвори с концентрация на калция $1,75 \text{ mmol/l}$.

Проучването е одобрено от Комисията по етика на научните изследвания към Медицински университет „Проф. Д-р Параскев Стоянов“ Варна.

Първа група:

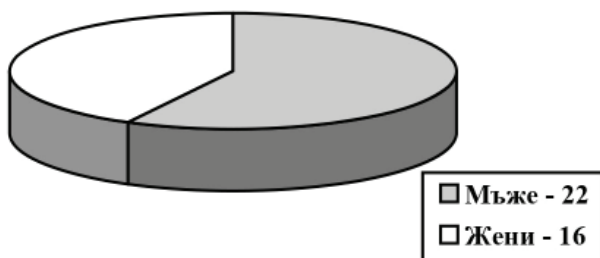
117 изследвани лица (Фиг. 1.). От тях 63 жени, на възраст от 42 до 81 години, средно 64,8 години; ръст от 149 до 175 см, средно 161,6 см; телесна маса от 45,5 до 91,5 кг, средно 58,4 кг. Среден индекс на телесна маса (BMI) 22,5. Продължителност на диализното лечение от 4 месеца до 11 години, средно 5 години и 4 месеца. Останалите 54 са мъже, на възраст от 26 до 82 години, средно 58,6 години; ръст от 156 до 188 см, средно 174,5 см; телесна маса от 44,0 до 104,5 кг, средно 72,8 кг. Среден индекс на телесна маса (BMI) 24,05. Продължителност на диализното лечение от 4 месеца до 17 години, средно 3 години и 7 месеца. Всички получават Алфакалцидол перорално, 2 пъти седмично по 1 μg . Общата седмична доза е 2 μg . Периодът на наблюдение е 5 месеца.



Фиг. 1. Първа група, третирана с Алфакалцидол (N=117)

Втора група:

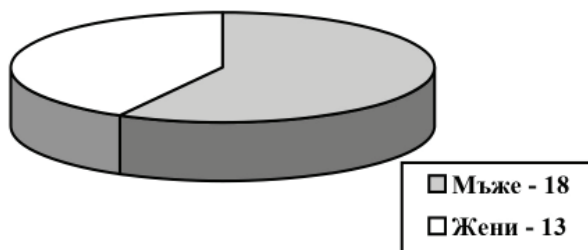
38 изследвани лица (Фиг.2.). От тях 16 жени, на възраст от 23 до 71 години, средно 54,3 години; ръст от 148 см до 177 см, средно 159,0 см; телесна маса от 59,0 кг до 91,0 кг, средно 64,2 кг. Среден индекс на телесна маса (BMI) 25,39. Продължителност на диализното лечение от 4 месеца до 12 години и 3 месеца, средно 4 години и 1 месец. Останалите са 22 мъже, на възраст от 29 до 79,5 години, средно 59,7 години; ръст от 154 см до 182 см, средно 169,1 см, телесна маса от 49,0 кг до 82,0 кг, средно 67,3 кг. Среден индекс на телесна маса (BMI) 23,56. Продължителност на диализното лечение от 4 месеца до 8 години и 9 месеца, средно 3 години и 5 месеца. Всички получават калцитриол в доза 0,25 μg дневно. Общата седмична доза е 1,75 μg .



Фиг. 2. Втора група, третирана с Калцитриол (N=38)

Трета група:

31 изследвани лица (Фиг.3.). От тях 13 жени, на възраст от 21 до 70 години, средно 49,4 години; ръст от 150,0 см до 165,0 см, средно 155,7 см; телесна маса от 52,5 кг до 90,5 кг, средно 62,6 кг. Среден индекс на телесна маса (BMI) 26,06. Продължителност на диализното лечение от 4,5 месеца до 9,0 години, средно 3 години и 9 месеца. Останалите са 18 мъже, на възраст от 25 години до 72,4 години, средно 53,3 години; ръст от 163 см до 187 см, средно 170,1 см; телесна маса от 46,8 кг до 95,0 кг, средно 72,4 кг. Среден индекс на телесна маса (BMI) 25,05. Продължителност на диализното лечение от 4 месеца до 10 години и един месец, средно 4 години.

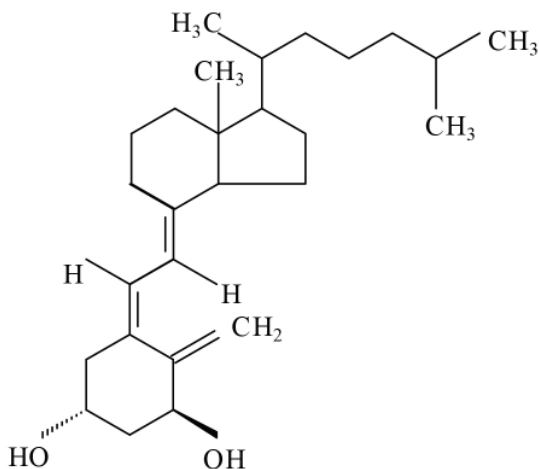


Фиг. 3. Трета група – контролна (N=31)

4.2. Прилагани аналози на витамин D

4.2.1. Алфакалцидол

Алфакалцидолът (1-алфа-хидроксиколекалциферол) е синтетичен аналог на витамин D₃. (Фиг. 4) В черния дроб се превръща в калцитриол (1,25-дихидроксиколекалциферол). Калцитриолът е активният метаболит на витамин D (холекалциферол), необходим за поддържането на калциево-фосфорната хомеостаза. Стимулира основно интестиналната резорбция на калций. Поради силно ограниченото 1-алфа-хидроксилиране в бъбреците в 5-ти стадий на ХБЗ, субституцията с алфакалцидол дава възможност за образуване на достатъчно калцитриол. Така се осигурява предотвратяване на недостига на витамин D и свързаните с него нежелани последици. 25-хидроксилирането на алфакалцидола *in vivo* в черния дроб е бързо и надеждно. Фармако-кинетичният профил максимално наподобява естествените физиологични процеси. Показва максимална плазмена концентрация около 60 pg/ml, която се достига приблизително за 8 часа.



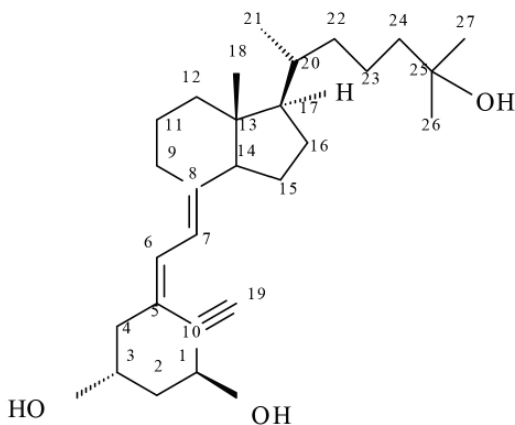
Фиг. 4. Химична формула на алфакалцидол

Алфакалцидолът е приеман перорално, 2 пъти седмично по 1 μg . Периодът на наблюдение е 5 месеца.

4.2.2. Калцитриол

Калцитриолът (1,25-дихидроксиголекалциферол) е аналог на витамин D (голекалциферол), необходим за поддържането на калциево-фосфорната хомеостаза. Калцитриолът подпомага усвояването на калций от храната в червата, както и реабсорбцията в бъбреците и регулира костната минерализация. Понижава повишените нива на серумните фосфати, понижава костната резорбция, понижава повишените нива на ПТХ. Препаратът е бяло кристално вещество с молекулно тегло 416,65 D. Разтваря се добре в органични разтворители, но е трудно разтворим във вода. Химически калцитриолът представлява 9,10-секо(5Z,7E)-5,7,10(19)-голеостатриен-1 α , 3 β , 25-триол. Химичната формула е с две хидроксилни групи на 1-во и на 25-то място. (Фиг. 5) Ефектът започва на втория до шестия час след перорален прием, трае около 3 до 5 дни. Максимална плазмена концентрация се достига за около 3 до 6 часа. Свързва се с протеини до 99,9%. Метаболизира се от 24-хидролазата до калцитроична киселина, а също и чрез постепенно хидроксилиране до витамин D лактонов пръстен. Елиминира се 50% с фецеса и 16% с урината. Често се обозначава и като

1 α ,25-дихидрокси-холекалциферол, 1,25-дихидроксивитамин D₃, или 1,25(OH)₂D₃.



Фиг. 5. Химична формула на калцитриол

Калцитриолът е приеман перорално, по 0,25 μ g на ден. Периодът на наблюдение е 5 месеца.

4.3. Изследвани показатели

Изследвани са стойностите на Са, Р, АФ, ПТХ, С-реактивен протеин и Бета₂-микроглобулин в серум.

Калцият, фосфорът и алкалната фосфатаза са определени в началото (изходна стойност) и ежемесечно (5 измервания) до края на периода.

ПТХ е проследен в началото и в края на периода на наблюдение.

Бета₂-микроглобулин и С-реактивен протеин са изследвани в началото и края на третия месец.

Показателите са проследявани при рутинно вземане на кръв за контрол на състоянието на пациентите на хронична хемодиализа. Пробите са изследвани в стандартна лицензирана клинична лаборатория.

4.4. Лабораторни методи

4.4.1. Калций

Калцият е определян в серум, фотометрично, по стандартен метод в две стъпки с орто-крезолфталейн, на автоматизирана анализаторна система. Референтни стойности за възрастни: 2,20-2,55 mmol/l.

4.4.2. Фосфор

Фосфорът е определян в серум, фотометрично, по стандартен метод в две стъпки, на автоматизирана анализаторна система. Референтни стойности за възрастни: 0,87-1,45 mmol/l.

4.4.3. Алкална фосфатаза

Определя се обща активност на алкална фосфатаза в серум, фотометрично, на автоматизирана анализаторна система. Референтни стойности: мъже 53 – 128 U/l, жени 42 - 98 U/l (над 60 г. до 141 U/l).

4.4.4. ПТХ

Определя се интактен ПТХ в плазма, с хемилуминесцентен имуноанализ (CLIA) на автоматизирана система за анализ. Референтни стойности: 15 – 65 pg/ml.

4.4.5. С-реактивен протеин

С-реактивен протеин се определя в серум, имунотурбидиметрично, на автоматичен анализатор. Референтни стойности: < 6.00 mg/l.

4.4.6. Бета₂-микроглобулин

Бета₂-микроглобулин се определя в серум, имунотурбидиметрично, на автоматичен анализатор. Референтни стойности: 0,8 – 2,2 mg/l.

4.5. Статистическа обработка

Статистическият анализ на стойностите е направен в сътрудничество с Катедра „Статистика“ на Икономическия университет гр. Варна с ръководител доц. Веселин Хаджиев, д.и.

За статистическа обработка на резултатите са използвани два различни параметрични теста. Основният използван инструмент е параметричният Student's T-test, one tail, при изчисленията е взета под внимание различната дисперсия на измерените стойности при всяка група. За по-голяма сигурност резултатите са проверявани едновременно чрез параметричен еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA. Целта е потвърждаване на

изведената статистическа значимост. Резултатите са изчислени с функции за статистически анализ на Microsoft Excel.

Освен параметрични тестове обобщени в табличен вид са добавени и графики за интуитивен визуален анализ на динамиката и различията в резултатите.

При прилагането на статистическите тестове е прието, че измерванията за отделните изследвани групи (статистически извадки) са независими. Измерванията за даден разглеждан параметър на една група не са функция от измерванията и резултатите на останалите групи. Фокусът на статистическото изследване е насочен към средноаритметичните стойности на измерените параметри при всяка група.

При използваният Student's T-test се формулират две основни хипотези. Нулевата хипотеза H_0 гласи, че няма промяна между разглежданите две средни стойности от две последователни във времето измервания или от две различни групи. Алтернативната хипотеза H_1 гласи, че между две разглеждани средни стойности е налице статистически значима разлика произхождаща от увеличение/намаление при последващо измерване или разлика между две различни групи.

За проверка на изведените резултати е използван дисперсионен анализ ANOVA, при който също са формулирани две хипотези. Нулевата хипотеза H_0 гласи, че не се наблюдава значима разлика между изследваните средни стойности. Алтернативната хипотеза H_1 гласи, че поне една от разглежданите две или повече средни стойности е различна от останалите.

5. РЕЗУЛТАТИ

Всички получени резултати за параметрите калций, фосфор и алкална фосфатаза са обобщени в шест групи от 1 до 6, които съответстват на времеви пункт на вземане на пробите за изследването, което е съответното измерване. Група 1 съответства на изходния начален момент преди приемането на дериватите на витамин D. Група 2 съответства на резултатите получени на първия месец след прилагането на витамин D-деривати. Група 3 съответства на втория месец от проучването два месеца след прилагането на витамин D-деривати. Група 4, 5 и 6 отговарят съответно на, трети, четвърти и пети месец от проучването след започване прилагането на витамин D-деривати. Това разпределение на получените резултати по групи се прилага при всички таблици и фигури за параметрите калций, фосфор и алкална фосфатаза.

Резултатите за параметъра паратхормон са обобщени в две групи. Първа група 1 съответства на изходния начален момент преди приемането на дериватите на витамин D. Втора група 2 съответства на резултатите получени на петия месец след прилагането на витамин D-деривати.

Резултатите за параметрите C-реактивен протеин и бета₂-микроглобулин са обобщени в две групи. Първа група 1 съответства на изходния начален момент преди приемането на дериватите на витамин D. Втора група 2 съответства на резултатите получени на третия месец след прилагането на витамин D-деривати.

5.1. Калций

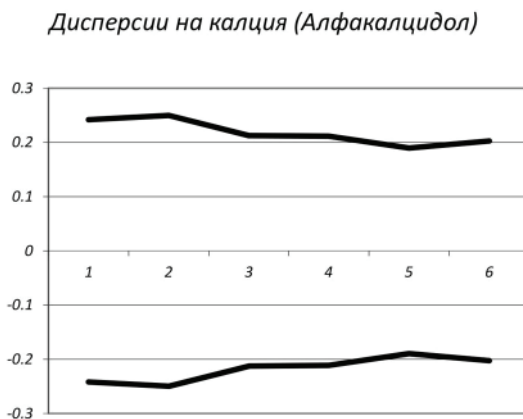
5.1.1. Калций – група с Алфакалцидол

5.1.1.1. Средни серумни нива на калций – група с Алфакалцидол.



Фиг. 6. Средни серумни нива на калций – група с Алфакалцидол

5.1.1.2. T-test и ANOVA на средни нива на калций – група с Алфакалцидол



Фиг. 7. Средноквадратично отклонение на серумно ниво на калций – група с Алфакалцидол

Проведеният T-test разкрива статистически значимо ($p \leq 0,0001$) повишение на средната стойност на серумното ниво на калций от $2,34 \pm 0,02$

mmol/l на $2,52 \pm 0,02$ mmol/l при последното шесто измерване. Проверката чрез ANOVA потвърждава убедителната промяна в средните стойности ($p \leq 0,0001$) (Фиг. 6.).

5.1.1.3. Дисперсии на серумни нива на калций – група с Алфакалцидол

При последователните измервания на серумните нива на калций при групата с прием на Алфакалцидол се наблюдава стесняващ се коридор на дисперсията в групата при всяко следващо измерване. Във времето отделните стойности се доближават все повече към средната стойност. Общо групата става по-хомогенна, дисперсията намалява (Фиг. 7.).

5.1.2. Калций – група с Калцитриол

5.1.2.1. Средни серумни нива на калций – група с Калцитриол



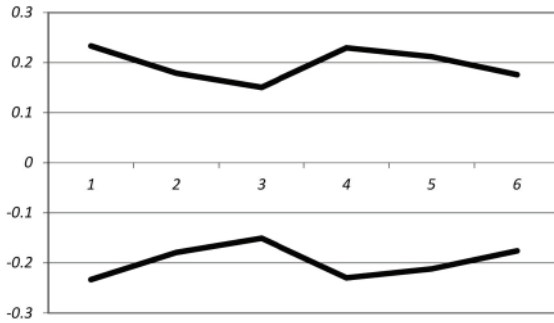
Фиг. 8. Средни серумни нива на калций – група с Калцитриол

5.1.2.2. T-test и ANOVA на средни нива на калций – група с Калцитриол

В групата с прием на Калцитриол средните стойности се променят от $2,24 \pm 0,04$ mmol/l при първото измерване на $2,19 \pm 0,03$ mmol/l при последното. Разликата в средните стойности не е статистически значима ($p \leq 0,1377$), приемаме нулевата хипотеза H_0 , според която не се доказва изменение (Фиг. 8.).

5.1.2.3. Дисперсии на серумни нива на калций – група с Калцитриол

Дисперсии на калция (Калцитриол)



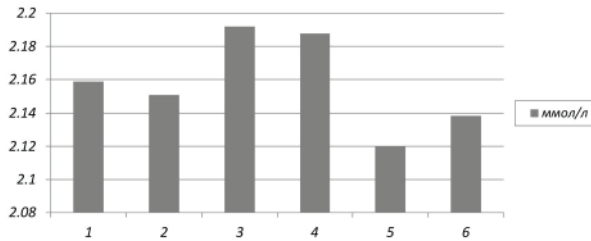
Фиг. 9. Средноквадратично отклонение на серумно ниво на калций – група с Калцитриол

Промените в дисперсията на стойностите при последователните измервания не показват определена посока, наблюдава се първоначално намаляване и отново нарастване до изходната стойност (Фиг. 9.).

5.1.3. Калций – Контролна група

5.1.3.1. Средни серумни нива на калций – Контролна група

Серумни нива на калций (Контрола)



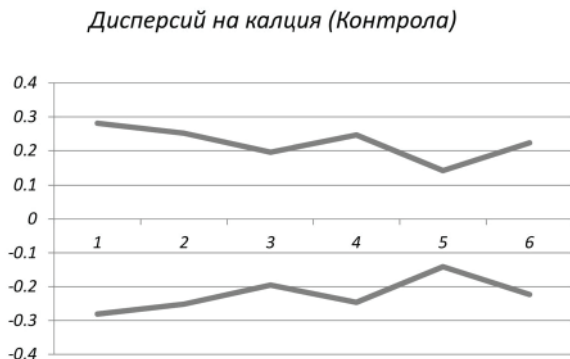
Фиг. 10. Средни серумни нива на калций – контролна група

5.1.3.2. T-test и ANOVA на средни серумни нива на калций – Контролна група

Промяната на средната стойност на серумни нива на калций

при контролната група от $2,16 \pm 0,05$ mmol/l на $2,14 \pm 0,04$ mmol/l не е статистически значима ($p \leq 0,38$) (Фиг. 10.).

5.1.3.3. Дисперсии на серумни нива на калций – Контролна група



Фиг. 11. Средноквадратично отклонение на серумно ниво на калций – контролна група

Промените в дисперсията на стойностите при измерванията на контролната група не показват ясно изразена посока, редуват се увеличение и намаление на коридора (Фиг. 11.).

5.1.4. Анализ - сравнение на средните стойности при последно измерване

5.1.4.1. Сравнение група Алфакалцидол и група Калцитриол

При сравнение с T-test на средните серумни нива на калций при последното измерване между групите с прием на Алфакалцидол и с прием на Калцитриол се наблюдава статистически значима разлика ($p \leq 0,0001$). Групата с Алфакалцидол има средна стойност $2,52 \pm 0,02$ mmol/l, а групата с Калцитриол $2,19 \pm 0,03$ mmol/l.

5.1.4.2. Сравнение група Алфакалцидол и контролна група

При последното измерване средната стойност на нивата на калций в групата с Алфакалцидол е $2,52 \pm 0,02$ mmol/l и е значително по-висока от стойността $2,14 \pm 0,04$ mmol/l при контролната група ($p \leq 0,0001$).

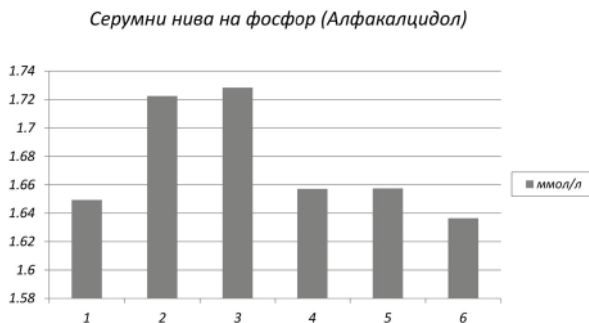
5.1.4.3. Сравнение група Калцитриол и контролна група

Средните стойности на серумните нива на калция при последното измерване на групата с Калцитриол ($2,18 \pm 0,03$ mmol/l) и контролната група ($2,14 \pm 0,04$ mmol/l) не показват статистически значима разлика.

5.2. Фосфор

5.2.1. Фосфор – група с Алфакалцидол

5.2.1.1. Средни серумни нива на фосфор – група с Алфакалцидол



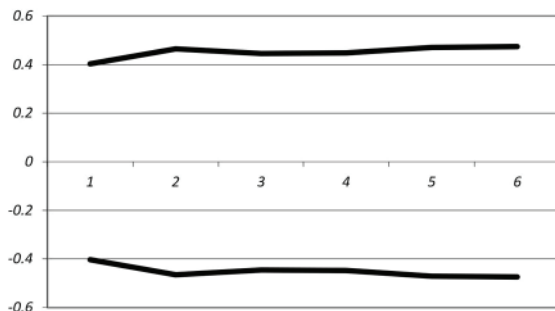
Фиг. 12. Средни серумни нива на фосфор – група с Алфакалцидол

5.2.1.2. T-test и ANOVA на средни нива на фосфор – група с Алфакалцидол

Промяната в средната стойност на серумните нива на фосфор от $1,65 \pm 0,04$ mmol/l при първото измерване на $1,64 \pm 0,04$ mmol/l при последното измерване не е статистически значима ($p \leq 0,41$). Приемаме нулевата хипотеза H_0 , от статистическа гледна точка няма разлика в средните стойности. Заключението се потвърждава и от резултатите на ANOVA (Фиг. 12.).

5.2.1.3. Дисперсии на серумни нива на фосфор – група с Алфакалцидол

Дисперсии на фосфора (Алфакалцидол)



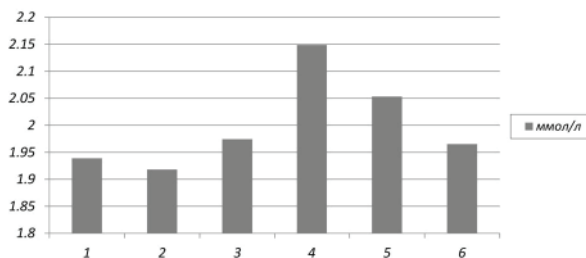
Фиг. 13. Средноквадратично отклонение на серумно ниво на фосфор – група с Алфакалцидол

При последователните измервания на нивата на фосфор при групата с Алфакалцидол има слабо изразено увеличаване на дисперсията при всяко измерване, видимо от разширяващия се коридор (Фиг. 13.).

5.2.2. Фосфор – група с Калцитриол

5.2.2.1. Средни серумни нива на фосфор – група с Калцитриол

Серумни нива на фосфор (Калцитриол)



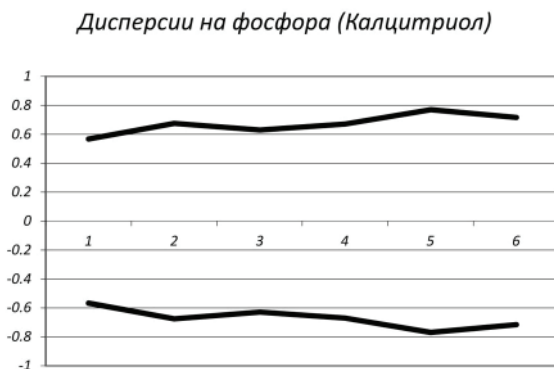
Фиг. 14. Средни серумни нива на фосфор – група с Калцитриол

5.2.2.2. T-test и ANOVA на средни нива на фосфор – група с Калцитриол

При сравнение между първата и последната средна стойност на групата с прием на Калцитриол също не се наблюдава статистически значима разлика. Промяната от $1,94 \pm 0,09$ mmol/l в началото на $1,97 \pm 0,12$ mmol/l не

е убедителна ($p \leq 0,4298$) (Фиг. 14.).

5.2.2.3. Дисперсии на серумни нива на фосфор – група с Калцитриол



Фиг. 15. Средноквадратично отклонение на серумно ниво на фосфор – група с Калцитриол

Дисперсията на серумните нива на фосфор показва склонност към увеличение с всяко следващо измерване. Коридорът се разширява, при групата с прием на Калцитриол се наблюдава нарастващо разпръскване на отделните стойности около средната за измерването (Фиг. 15.).

5.2.3. Фосфор – Контролна група

5.2.3.1. Средни серумни нива на фосфор – Контролна група

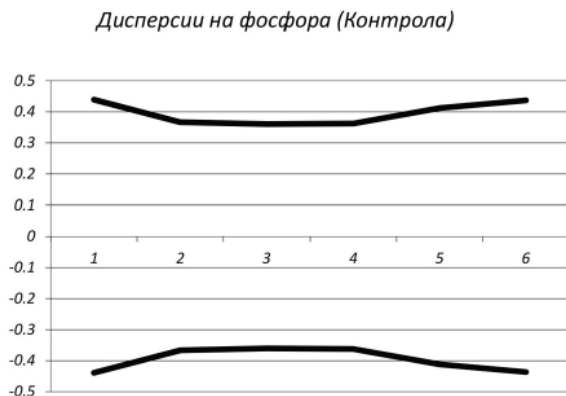


Фиг. 16. Средни серумни нива на фосфор – контролна група

5.2.3.2 T-test на средни нива на фосфор – Контролна група

Промяната в средните стойности на контролната група от $1,89 \pm 0,08$ mmol/l в началото на $2,06 \pm 0,08$ mmol/l при последното измерване разкрива увеличение. От статистическа гледна точка няма доказателства за значима разлика ($p \leq 0,0648$) (Фиг. 16.).

5.2.3.3. Дисперсии на серумни нива на фосфор – Контролна група



Фиг. 17. Средноквадратично отклонение на серумно ниво на фосфор – контролна група

При контролната група серумните нива на фосфор разкриват колеблива дисперсия, с намаление след първото измерване и склонност към увеличение и разширяване на коридора до последното измерване (Фиг. 17.).

5.2.4. Анализ - сравнение на средните стойности при последно измерване

5.2.4.1. Сравнение група Алфакалцидол и група Калцитриол

При последното измерване средната стойност на серумните нива на фосфор при групата с Алфакалцидол $1,64 \pm 0,04$ mmol/l е статистически убедително по-ниска от средната стойност при групата с Калцитриол $1,97 \pm 0,12$ mmol/l. При ($p \leq 0,0054$) приемаме алтернативната хипотеза H_1 , налице е доказателство за разлика в средните стойности.

5.2.4.2. Сравнение група Алфакалцидол и контролна група

При последното измерване на серумните нива на фосфор групата с прием на Алфакалцидол показва по-ниска средна стойност в сравнение с контролната група. Разликата между $1,64 \pm 0,04$ mmol/l и $2,06 \pm 0,08$ mmol/l е

статистически ясно изразена ($p \leq 0,0001$).

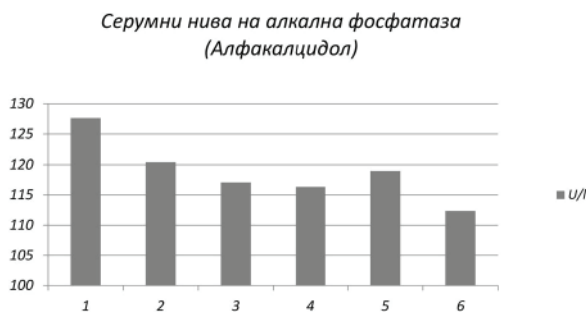
5.2.4.3. Сравнение група Калцитриол и контролна група

Сравнение на средните стойности при последното измерване не показва убедителна разлика между групата с прием на Калцитриол ($1,97 \pm 0,12$ mmol/l) и контролната група ($2,06 \pm 0,08$ mmol/l).

5.3. Алкална фосфатаза

5.3.1. Алкална фосфатаза – група с Алфакалцидол

5.3.1.1. Средни серумни нива на алкална фосфатаза – група с Алфакалцидол



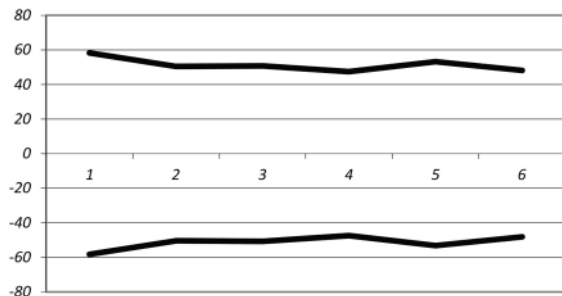
Фиг. 18. Средни серумни нива на алкална фосфатаза – група с Алфакалцидол

5.3.1.2. T-test и ANOVA на средни нива на алкална фосфатаза – група с Алфакалцидол

Средните серумни нива на алкална фосфатаза в групата с прием на Алфакалцидол намаляват устойчиво от $127,64 \pm 5,39$ U/l при първото измерване на $112,34 \pm 4,45$ U/l при последното измерване. Разликата е статистически значима съгласно използвания T-test ($p \leq 0,0148$) (Фиг. 18.).

5.3.1.3. Дисперсии на серумни нива на алкална фосфатаза – група с Алфакалцидол

*Дисперсии на алкална фосфатаза
(Алфакалцидол)*



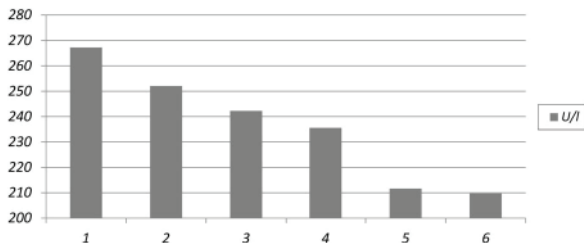
Фиг. 19. Средноквадратично отклонение на серумно ниво на алкална фосфатаза – група с Алфакалцидол

Намаляването на средните серумни нива на алкална фосфатаза е съпътствано от стесняващ се коридор на дисперсия при всяко последващо измерване. С времето измерените стойности се движат по-близко до средната стойност за цялата група (Фиг. 19.).

5.3.2. Алкална фосфатаза – група с Калцитриол

5.3.2.1. Средни серумни нива на алкална фосфатаза – група с Калцитриол

*Серумни нива на алкална фосфатаза
(Калцитриол)*

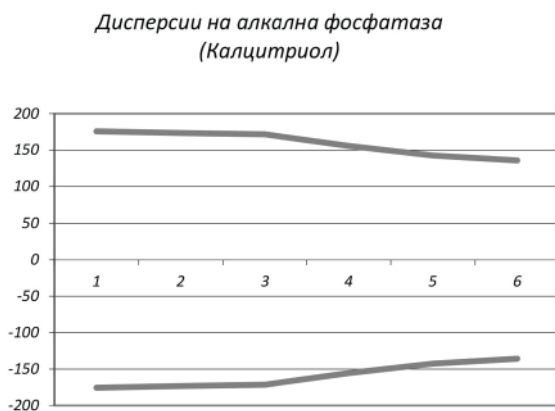


Фиг. 20. Средни серумни нива на алкална фосфатаза – група с Калцитриол

5.3.2.2. T-test и ANOVA на средни нива на алкална фосфатаза – група с Калцитриол

При групата с прием на Калцитриол се наблюдава устойчива тенденция на намаляване на средните серумни нива на алкална фосфатаза от $267,21 \pm 28,88$ U/l на $209,72 \pm 22,31$ U/l в края на изследвания период. Сравнението чрез T-test доказва статистически значима разлика ($p \leq 0,0599$) (Фиг. 20.).

5.3.2.3. Дисперсии на серумни нива на алкална фосфатаза – група с Калцитриол



Фиг. 21. Средноквадратично отклонение на серумно ниво на алкална фосфатаза – група с Калцитриол

Анализът на дисперсията при измерванията на групата с Калцитриол отново разкрива образуването на стесняващ се коридор около средните серумни нива, което е индикатор за стабилизиране на резултатите и образуването на по-хомогенна група с времето. Стесняващият се коридор и едновременното понижаване на средните серумни нива на алкална фосфатаза подчертават действието на Калцитриола (Фиг. 21.).

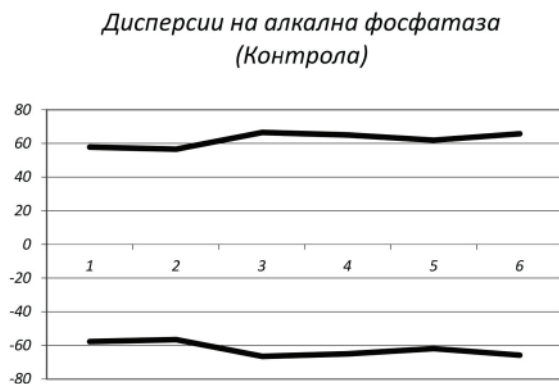
5.3.3. Алкална фосфатаза – Контролна група

5.3.3.1. Средни серумни нива на алкална фосфатаза – Контролна група



Фиг. 22. Средни серумни нива на алкална фосфатаза – контролна група

5.3.3.2. T-test на средни нива на алкална фосфатаза – Контролна група



Фиг. 23. Средноквадратично отклонение на серумно ниво на алкална фосфатаза – контролна група

Средните стойности на нивата на алкална фосфатаза в контролната група отбелязват общо неустойчиво увеличение от $154,16 \pm 10,37$ U/l на $158,42 \pm 11,81$ U/l, което от статистическа гледна точка не е значимо ($p \leq 0,3937$) (Фиг. 22.).

5.3.3.3. Дисперсии на серумни нива на алкална фосфатаза – Контролна група

Коридорът на дисперсия около средните стойности на контролната група се разширява, което заедна с променливото поведение на средните стойности не дава индикация за ясна тенденция в измерванията (Фиг. 23.).

5.3.4. Анализ - сравнение на средните стойности при последно измерване

5.3.4.1. Сравнение група Алфакалцидол и група Калцитриол

При сравнение на последните средни стойности на серумните нива на алкална фосфатаза се наблюдава статистически убедителна ($p \leq 0,0001$) разлика между групата с Алфакалцидол ($112,34 \pm 4,45$ U/I) и групата с Калцитриол ($209,79 \pm 22,31$ U/I).

5.3.4.2. Сравнение група Алфакалцидол и контролна група

Сравнение чрез T-test между средните серумни нива при последното измерване доказва също значима ($p \leq 0,0004$) разлика между групата с прием на Алфакалцидол ($112,34 \pm 4,45$ U/I) и контролната група ($158,42 \pm 11,81$ U/I).

5.3.4.3. Сравнение група Калцитриол и контролна група

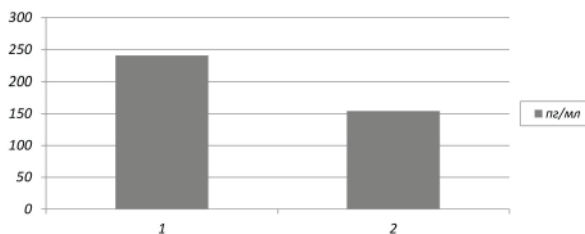
Средната стойност от $209,72 \pm 22,31$ U/I при последното измерване на групата с Калцитриол е по-висока от тази на контролната група в края на изследването $158,42 \pm 11,81$ U/I. Разликата е статистически значима ($p \leq 0,0235$).

5.4. Паратхормон

5.4.1. Паратхормон – група с Алфакалцидол

5.4.1.1. Средни серумни нива на паратхормон – група с Алфакалцидол

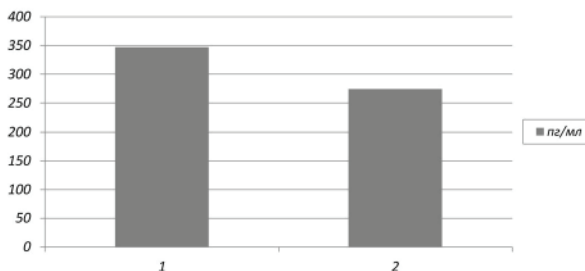
Серумни нива на паратхормон (Алфакалцидол)



Фиг. 24. Средни серумни нива на паратхормон

5.4.1.2. T-test и ANOVA на средни нива на паратхормон – група с Алфакалцидол

Серумни нива на паратхормон (Калцитриол)



Фиг. 25. Средни серумни нива на паратхормон – група с Калцитриол

Средните стойности на серумните нива на паратхормон при групата с прием на Алфакалцидол намаляват убедително от $240,41 \pm 20,64$ pg/ml в началото на $154,05 \pm 12,82$ pg/ml в края на изследването. Резултатът е статистически значим ($p \leq 0,0002$) и се потвърждава от направения ANOVA (Фиг. 24.).

5.4.2. Паратхормон – група с Калцитриол

5.4.2.1. Средни серумни нива на паратхормон – група с Калцитриол

5.4.2.2. T-test и ANOVA на средни нива на паратхормон – група с Калцитриол

При сравнението чрез T-test на измерените средни серумни нива на паратхормон в групата с Калцитриол намаляването от $346,97 \pm 66,88$ pg/ml на $274,06 \pm 55,00$ pg/ml не е статистически значимо ($p \leq 0,2036$) (Фиг. 25.).

5.4.3. Анализ - сравнение на средните стойности при последно измерване

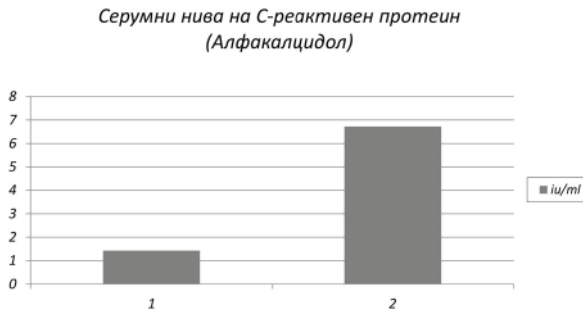
5.4.3.1. Сравнение група Алфакалцидол и група Калцитриол

При сравнение между последните средни стойности на групата с Алфакалцидол и групата с Калцитриол се наблюдава статистически значима разлика ($p \leq 0,0247$). Средното ниво на групата с Алфакалцидол $154,05 \pm 12,82$ pg/ml е значително по-ниско от това на групата с Калцитриол $274,06 \pm 55,00$ pg/ml.

5.5. С-реактивен протеин

5.5.1. С-реактивен протеин – група с Алфакалцидол

5.5.1.1. Средни серумни нива на С-реактивен протеин – група с Алфакалцидол



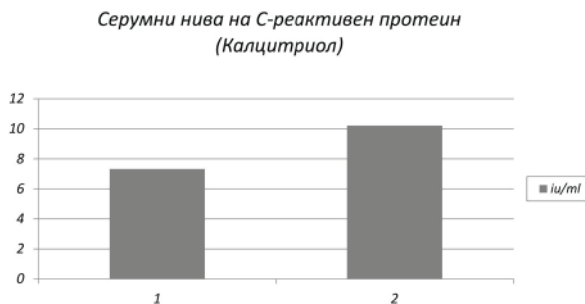
Фиг. 26. Средни серумни нива на С-реактивен протеин – група с Алфакалцидол

5.5.1.2. T-test и ANOVA на средни нива на С-реактивен протеин – група с Алфакалцидол

При групата с прием на Алфакалцидол направеният T-test показва, че средната стойност на С-реактивния протеин се увеличава от $1,43 \pm 0,54$ mg/l на $6,72 \pm 2,90$ mg/l в края на изследването, при гранична стойност на достоверност ($p \leq 0,0471$). Тест чрез ANOVA не подкрепя убедително увеличението (Фиг. 26.).

5.5.2. С-реактивен протеин – група с Калцитриол

5.5.2.1. Средни серумни нива на С-реактивен протеин – група с Калцитриол



Фиг. 27. Средни серумни нива на С-реактивен протеин – група с Калцитриол

5.5.2.2. T-test и ANOVA на средни нива на С-реактивен протеин – група с Калцитриол

Сравнение на средните нива на С-реактивен протеин при групата с Калцитриол не показва статистически значима разлика ($p \leq 0,3050$). Нарастването от $7,32 \pm 2,36$ mg/l на $10,21 \pm 5,03$ mg/l не е убедително според използваните тестове (Фиг. 27.).

5.5.3. Анализ - сравнение на средните стойности при последно измерване

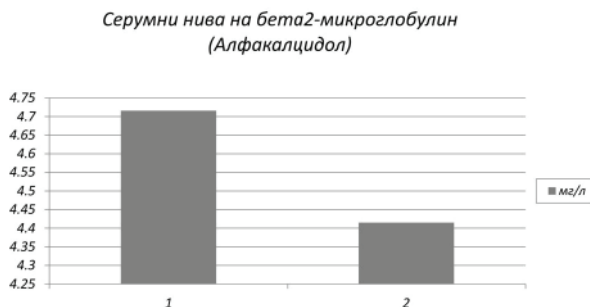
5.5.3.1. Сравнение група Алфакалцидол и група Калцитриол

Сравнение между средните стойности в края показва, че няма значима разлика ($p \leq 0,2775$) между групата с Алфакалцидол ($6,72 \pm 2,90$ mg/l) и групата с Калцитриол ($10,21 \pm 5,03$ mg/l).

5.6. Бета₂-микроглобулин

5.6.1. Бета₂-микроглобулин – група с Алфакалцидол

5.6.1.1. Средни серумни нива на бета₂-микроглобулин – група с Алфакалцидол



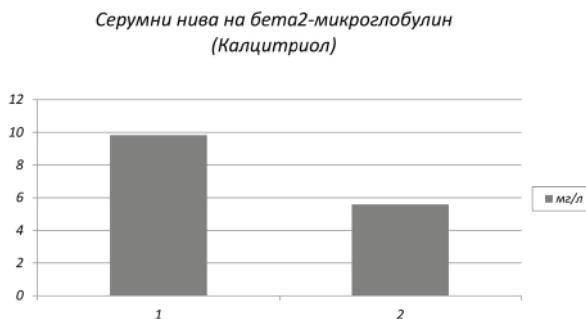
Фиг. 28. Средни серумни нива на бета₂-микроглобулин – група с Алфакалцидол

5.6.1.2. T-test и ANOVA на средни нива на бета₂-микроглобулин – група с Алфакалцидол

При групата с прием на Алфакалцидол се констатира видимо намаление на средните серумни нива на бета₂-микроглобулин от 4,72±0,09 mg/l на 4,42±0,12 mg/l. Допълнително доказателство предоставят изчисленият T-test ($p \leq 0,0301$) и ANOVA (Фиг. 28.).

5.6.2. Бета₂-микроглобулин – група с Калцитриол

5.6.2.1. Средни серумни нива на бета₂-микроглобулин – група с Калцитриол



Фиг. 29. Средни серумни нива на бета₂-микроглобулин – група с Калцитриол

5.6.2.2. T-test и ANOVA на средни нива на бета₂-микроглобулин – група с Калцитриол

При групата с прием на Калцитриол също се наблюдава статистически значимо ($p \leq 0,0001$) намаление на средното серумно ниво на бета₂-микроглобулин от $9,83 \pm 0,14$ mg/l в началото на $5,59 \pm 0,47$ mg/l края на изследването. Тест направен с ANOVA допълнително подкрепя резултата (Фиг. 29).

5.6.3. Анализ - сравнение на средните стойности при последно измерване

5.6.3.1. Сравнение група Алфакалцидол и група Калцитриол

Средните нива на бета₂-микроглобулин в края на изследването са статистически убедително ($p \leq 0,0140$) по-ниски при групата с Алфакалцидол ($4,42 \pm 0,12$ mg/l) в сравнение с тези на групата с Калцитриол ($5,59 \pm 0,47$ mg/l).

6. ОБСЪЖДАНЕ

Нарушенията в минералния метаболизъм са едни от най-важните фактори, които влошават качеството на живот и увеличават заболяемостта и смъртността, особено поради сърдечно-съдови инциденти при пациентите на хемодиализа. Нарушеният синтез на витамин D₃ с последващите хипокалциемия, хиперфосфатемия, хиперпаратиреоидизъм и засягането на сърдечно-съдовата система формират сложна система от неблагоприятни фактори. Използването на възможностите за повлияване на всеки от тях забавя хода на заболяването (Йонова, 2004; Любомирова, 2009). Заместителното лечение с аналози на витамин D е един от основните инструменти за въздействие и коригиране на тези нарушения. Корекцията на минералния метаболизъм и секрецията на ПТХ си остават истинско терапевтично предизвикателство. В последните години се доказва, че витамин D има и много други въздействия, освен класическите, свързани с костната обмяна. Затова в настоящото проучване се цели и изясняване и на други негови ефекти. За целта се изследват и параметри, нетипични за минералната обмяна.

6А. Параметри на минералния метаболизъм

Прилагането на аналози на витамин D при заместителната терапия на бъбречната функция изисква стриктно и редовно проследяване на серумните нива на редица показатели на минералния метаболизъм. Основните са калций, фосфор, алкална фосфатаза. Необходимо е също така и мониториране на ПТХ, основен хормонален регулатор за костните процеси и минералната хомеостаза.

6.1. Калций

Серумните нива на калция са основен показател, имащ отношение към процесите в костите, дейността на параситовидните жлези, сърдечно-съдовата система. Средната стойност на серумните нива на калций (Фиг.6) в изследваните от първа група, третирани с алфакалцидол, е $2,34 \pm 0,02$ mmol/l в началото на проучването, като най-ниската стойност е била 1,52 mmol/l. След започване на третирането с алфакалцидол в доза, съгласно утвърденото

клинично приложение и кратката характеристика, нивото започва да се покачва. При следващите две последователни измервания на втория и третия месец, стойностите се задържат на 2,45 mmol/l. На четвъртия месец следва леко увеличение до 2,49 mmol/l. При последните две измервания на четвърти и пети месец, стойностите са почти еднакви, като при крайното измерване за наблюдавания период се достигат нива от 2,52±0,02 mmol/l. Увеличението на серумния калций е статистически достоверно ($p \leq 0,0001$). При четирима изследвани при последното определяне на калций са установени стойности от около 2,8 mmol/l (2,84; 2,86; 2,82; 2,80), като при двама обаче всички останали стойности са значително по-ниски. Не са наблюдавани хиперкалцеимични клинични прояви. Приемът на Алфакалцидол е преустановен и се проследява с повишено внимание понижението на калция. След достигане на нормалните стойности суплементацията ще продължи с по-ниска доза. При разглеждане на дисперсията на стойностите през проследения период на наблюдение (Фиг.7), се установяват плавни промени, стесняване на „коридора” на дисперсия на резултатите и тяхното хомогенизиране. Калциевите нива се повишават постепенно, без резки отклонения, които да увеличат опасността от рязка хиперкалцеимия. Това вероятно е свързано и с фармако-кинетичния профил на алфакалцидол в организма, който е близък до нормалните физиологични процеси на получаване на активен витамин D₃. Изследванията съобщени от различни автори показват плавно повишаване и задържане на серумната калциева концентрация. При нашето проучване се наблюдава също плавно покачване на нивото на калций в серума. Определената при последното измерване средна стойност на серумния калций от 2,52±0,02 mmol/l е статистически достоверно по-висока от тази на контролната група (2,14±0,04 mmol/l) при $p \leq 0,0001$. Втора група от изследваните пациенти е третирана с калцитриол. И в този случай, както и при алфакалцидола, е спазен тримесечен период преди започване на приема на калцитриол, през който не са били приемани каквито и да е други аналози на витамин D. Началната стойност на серумния калций е 2,24±0,04 mmol/l, а при последното измерване е 2,18±0,03 mmol/l (Фиг.8). Промяната обаче не е статистически достоверна ($p \leq 0,1377$). При проследяване на дисперсията на стойностите няма ясна тенденция, след намаление в началото, следва увеличение почти до изходните стойности, като промените, макар и неголеми по стойност, настъпват по-рязко

(Фиг.9). Средните стойности на серумните нива на калция при последното измерване на групата с калцитриол ($2,18 \pm 0,03$ mmol/l) и контролната група ($2,14 \pm 0,04$ mmol/l) не показват статистически значима разлика ($p \leq 0,18$). Само при един изследван след приема на калцитриол последната стойност е $2,7$ mmol/l, което изисква да се изчака с приема на калцитриол до спадане на стойностите на серумния калций. Сравнението между последните стойности при първа и втора група при така получените резултати показва убедително по-високи стойности за групата с алфакалцидол ($p \leq 0,0001$). При контролната група има намаление в нивата на калция от $2,16 \pm 0,05$ mmol/l на $2,14 \pm 0,04$ mmol/l, но не е статистически значимо ($p \leq 0,38$) (Фиг.10). Промените в дисперсията на стойностите показват редуване на стеснения и разширявания на коридора без определена тенденция (Фиг.11).

По-ниските изходни стойности на серумния калций са следствие от нарушеното му усвояване поради нарушената бъбречна функция и силно намаления синтез на активния витамин D₃, 1,25-дихидроксихолекалциферол. С времето този процес предизвиква увеличаване на серумните нива на ПТХ за нормализирането на серумния калций. Развиват се вторичен хиперпаратиреоидизъм и бъбречна остео дистрофия като често и сериозно усложнение при пациентите на диализа. Прилагането на аналози на витамин D цели нормализиране на тези процеси. Таргетните стойности за серумен калций, цел на терапевтичната стратегия, са дефинирани по различен начин в литературата. Установено е, че след диализната процедура серумните нива на калция не намаляват, което е важно за начините на регулация на калция (Abe et al., 2013). Различни проучвания определят различни таргетни стойности – норма от $2,2$ до $2,6$ mmol/l (Jindal et al., 2006; BC Renal Agency 2010), или най-ниска нормална стойност – $2,2$ до $2,4$ mmol/l (National Kidney Foundation, KDOQI, 2003), или препоръка да се избягва хиперкалциемия (KDIGO, 2009). Референтните стойности на ползвания от нас лабораторен метод са от $2,20$ до $2,55$ mmol/l. Измерените от нас серумни нива на калций не са коригирани спрямо серумния албумин, защото всички изследвани са с нормален албумин, а уточнението е важно поради разликите в методиките (Clase et al., 2000; Goransson et al., 2005). Таргетните нива могат да бъдат съобразени с нивата на здравите, или с оптималната за преживяемостта на пациентите калциева концентрация (Abe et al., 2013). С прилагането на аналози на витамин D постигаме нормални нива и ги стабилизираме,

без настъпване на хиперкалциемични инциденти, което и се препоръчва по отношение на стойностите на серумния калций (Steddon et al., 2010). В първа група с прием на алфакалцидол в началото на проучването 30% от изследваните са били със значително по-ниски от нормата серумни калциеви стойности. При последното измерване само 3,4% са със стойности под нормалните. Това са четирима пациенти, при трима от тях стойностите са значително по-ниски, и са останали такива през целия период на наблюдение (1,68 mmol/l, 1,7 mmol/l, 1,52 mmol/l в края на периода). Най-вероятно те не се повлияват от алфакалцидол и при тях може да се обсъди прилагане на аналог на витамин D, действащ по друг механизъм. Липсата на сигнификантни промени във втора група с прием на калцитриол най-вероятно се дължи на недостатъчна доза на суплементиращата витамин D терапия. Нивата на серумния калций не се увеличават, но не се и намаляват. При избор на дозата сме се ръководили от добрите клинични практики, но и от стремежа да не се допуснат хиперкалциемични инциденти, като се има предвид фармако-кинетичния профил на калцитриола и неговото по-бързо действие. Смятаме, че тази задача е постигната. Субституцията с калцитриол може да продължи, като внимателно се увеличава дозата, и се следи нивото на серумния калций. Намалението при контролната група не е статистически достоверно, в началото 10 пациенти са били с поднормени стойности, а при последното измерване те са 11. Но и при тези, които имат нормални стойности, те са около долната граница на референтния интервал в края на наблюдавания период.

Данните от проведените в последните години проучвания не са идентични. Подобно на нашите резултати, Taggass et al., 2006, установяват повишение на серумния калций след прием на алфакалцидол, също Mitwalli et al., 2000, както и Kiattisunthorn, 2011. Без съществени промени в нивото на серумния калций и с подобни единични случаи на хиперкалциемия съобщават обаче в проучванията си Arenas et al., 2006; Al-Hilali, 2008, и Moe et al., 2008. Hayashi et al., 2004, в сравнително проучване установяват повишаване на серумния калций при прилагане на калцитриол. След прием на калцитриол, подобно на нашите резултати, и Arenas et al., 2006, както и Moe et al., 2008, не отчитат сигнификантни промени в нивата на серумния калций за периода на наблюдение.

Редовния мониторинг на серумните нива на калция е важен, защото са

установени сигнификантни зависимости между нивата на калция и риска от заболяемост и смъртност, независимо от други фактори.

Според препоръките на Канадското нефрологично дружество корекцията на хипокалциемията е с предимство пред корекцията на ниски серумни нива на ПТХ или високи серумни нива на фосфора; показани са калциеви препарати и аналози на витамин D (BCRenalAgency 2010). Има по-стари проучвания за зависимост между хипокалциемията и смъртността при диализните пациенти (Foley et al., 1996), което обаче не се потвърждава от други автори (Young et al., 2005). Противоречиви са данните и на Tentori et al., 2008, относно хипокалциемията и смъртността. Същевременно не трябва да се допуска и увеличаване на серумния калций над нормалните нива, защото хиперкалциемията е също рисков фактор за обща и сърдечно-съдова смъртност и ектопична калцификация (Block et al., 2004; Young et al., 2005; Kalantar-Zadeh et al., 2006; Fukagawa, 2013). На базата на тези натрупани знания Uhlig et al., 2010, подкрепят предложените препоръки за проследяване на серумните нива на калций от ежемесечно до на всеки 3 месеца. В съвсем скорошно проучване Taniguchi et al., 2013, установяват, че достигането на нормални стойности на серумния калций, особено заедно с нормални стойности на серумния фосфор би довело до добра преживяемост, като също се препоръчва редовното проследяване на нивата на серумния калций и фосфор.

В заключение може да се каже, че за периода на наблюдение под въздействие на алфакалцидол са достигнати и задържани нормални стойности на серумния калций, както и че няма промяна под въздействие на калцитриол в така приложените дози за проследения период.

6.2. Фосфор

Повишаването на нивата на фосфатите в кръвта в крайния стадий на ХБЗ е закономерна последица от силно увредената бъбречна функция. Екскрецията на фосфора е нарушена, настъпва фосфатна задръжка, намаляване нивото на активния витамин D₃, повишаване на секретирания паратиреоиден хормон. Стойността на серумните нива на фосфора и промяната им е важна и като показател на минералната обмяна. Хиперфосфатемията и хиперпаратиреоидизмът водят до отклонения

в костното ремоделиране. Повишените стойности на фосфора са прогностичен фактор за преживяемост и смъртност при диализните пациенти (Kestenbaum et al., 2005; Achinger et al., 2006; Palmer et al., 2011). Хиперфосфатемията е доказано свързана с процеси на калцификация на коронарните артерии и аортата, а сърдечно-съдовите инциденти са в основата на повишената смъртност при диализните пациенти (Goodman et al., 2000; Raggi et al., 2002; London et al., 2003; Tentori et al., 2008; Raggi et al., 2011). Затова редовното проследяване на фосфорните серумни нива и контролът на хиперфосфатемията са важен елемент от цялостната терапия на диализната популация. Регулирането на увеличените фосфати е сложен баланс от намаляване на приема с храната, намаляване на интестиналната резорбция при нужда чрез фосфат-свързващи съединения и увеличаване на отстраняването на фосфатите при диализната процедура чрез увеличаване на времетраенето на диализата. В нашето проучване стойностите на серумния фосфор са проследени ежемесечно, което се подкрепя и от препоръките за добра клинична практика (KDIGO; Uhlig et al., 2010). Таргетните стойности за серумен фосфор, цел на терапевтичната стратегия, са дефинирани по различен начин в литературата. Различни проучвания определят различни стойности – 1,1 до 1,8 mmol/l (National Kidney Foundation, KDOQI, 2003); стойности от 0,78 до 1,53 mmol/l (BCRenalAgency 2010); понижаване на повишените нива най-близо до нормални стойности (KDIGO, 2009); нива под 1,6 mmol/l предлагат Mitwalli et al., 2000. Референтните стойности на ползвания от нас лабораторен метод са от 0,87 до 1,45 mmol/l. При изследваните от първа група с прием на алфакалцидол началната стойност на серумния фосфор от $1,65 \pm 0,04$ mmol/l се променя в края на периода на $1,64 \pm 0,04$ mmol/l (Фиг.12), като тази промяна не е статистически значима ($p \leq 0,41$). Дисперсията на стойностите също показва слабо отклонение към разширяване на коридора (Фиг.13). При изследваните от втора група с прием на калцитриол също не се наблюдава разлика между началната и крайната стойност (Фиг.14), промяната от $1,94 \pm 0,09$ mmol/l на $1,97 \pm 0,12$ mmol/l не е статистически значима ($p \leq 0,42$). Коридорът на дисперсията също се разширява слабо (Фиг.15). И при контролната група повишението за периода на наблюдение от $1,89 \pm 0,08$ mmol/l на $2,06 \pm 0,08$ mmol/l не е статистически достоверно (Фиг.16, Фиг.17). Средните стойности и в трите групи са над нормалните. Вътрегруповият анализ също показва

преобладаване на повишените нива. Само 30% (55) от всички изследвани имат стойности в референтния интервал. Изследваните и от трите групи са наблюдавани внимателно за сърдечно-съдови усложнения, но такива не са установени. При преценка на рисковите фосфатни стойности в клиничната практика е прието да се изчислява и стойността на калциево-фосфорния продукт ($\text{Ca} \times \text{P}$) (препоръчвано от KDOQI и CARI Guidelines). Експертите от KDIGO обаче, както и други изследователи, не подкрепят този показател (BCRenalAgency 2010; O'Neill, 2007; Steddon et al., 2010). При 7 изследвани (3,9%) с хиперфосфатемия и повишаване на $\text{Ca} \times \text{P}$ -продукт над $4,44 \text{ mmol}^2/\text{l}^2$ (таргетна стойност препоръчвана от KDOQI и използвана и у нас) се прецени необходимостта от включване на фосфат-свързващи препарати към терапията. При тези изследвани имаше тенденция за поддържане на високи фосфатни стойности през целия период на наблюдение. При преценка на всички отделни стойности е съобразена общоприетата препоръка за наблюдение на тенденцията. Еднократно измерени повишени стойности на фосфора не са индикация за терапевтични промени. Освен това успоредно са проследявани и преценявани промените и на другите биохимични параметри. Изследваните не са били подложени на рискови натоварвания и са контролирани постоянно. Въпреки статистическата недостоверност на промените за периода на проучването, все пак наблюдавахме тенденция за повишение и достигане на най-високи средни стойности в края на проучването в контролната група. Данните на автори от други проучвания не са еднопосочни. Hayashi et al., 2004, не намират сигнификантни промени в стойностите на серумния фосфор при прилагане на калцитриол. Taggass et al., 2006, установяват тенденция за увеличение на серумния фосфор при третиране с алфакалцидол. Arenas et al., 2006, обаче намират подобрен фосфорен контрол след третиране с калцитриол и алфакалцидол. След въздействие на алфакалцидол Al-Hilali et al., 2008, не намират сигнификантни промени в нивата на серумния фосфор, както и при нашето проучване. Moe et al., 2008, не намират статистически достоверна промяна във фосфорните нива след прием на алфакалцидол и калцитриол, съвпадащо с нашите резултати. Kiattisunthorn et al., 2011, при сравняване ефектите на алфакалцидол и калцитриол, не установяват статистически достоверна промяна, а само тенденция за увеличаване на серумния фосфор в двата случая. Нашите резултати установяват подобна

тенденция за третираните с калцитриол, но не и при тези с алфакалцидол. Hansen, 2012, намира сигнификантно повишение на фосфатите при прием на алфакалцидол, но оставащо в рамките на целевата стойност $\leq 1,8$ mmol/l, на фона на прием на различни фосфат-свързващи съединения. Резултатите на различните автори, както и нашите, биха могли да бъдат обяснени с взаимоотношенията между ПТХ, витамин D₃, фосфатите, калция при ХБЗ. Увредената бъбречна функция води до увеличаване на фосфатите в плазмата. Те свързват допълнително калция, и така стимулират повишаване на секретирания ПТХ. Витамин D потиска секрецията на ПТХ, фосфатите се увеличават, като това се проявява особено при високите стойности на ПТХ, където се надхвърля физиологичната регулация между ПТХ и фосфатите (Hansen, 2012).

В заключение може да се каже, че няма статистически достоверни промени в нивата на серумния фосфор след приема на алфакалцидол и калцитриол за периода на проучването. Преобладаващата част от изследваните са с нива на фосфора по-високи от референтните стойности.

Увеличаване на броя на изследваните може евентуално да докаже положителен ефект на витамин D-аналозите и върху по-добрия контрол на фосфорните нива.

6.3. Алкална фосфатаза

Алкалната фосфатаза е важен показател, особено при диализни пациенти с бъбречна остеоидистрофия и вторичен хиперпаратиреоидизъм. Стойността ѝ отразява процесите на костна активност, включително костния търновър и костния метаболизъм (Fein et al., 2013; Magnusson et al., 2001). При изследваните от първа група с прием на алфакалцидол средните стойности на алкалната фосфатаза намаляват статистически достоверно от $127,64 \pm 5,39$ U/l на $112,34 \pm 4,45$ U/l при $p \leq 0,01$ (Фиг.18). Коридорът на дисперсията на стойностите се стеснява съответно на намалението и стойностите се приближават до средните (Фиг.19). За проследения период при изследваните от втора група с прием на калцитриол стойностите на алкалната фосфатаза също намаляват от $267,21 \pm 28,88$ U/l на $209,72 \pm 22,31$ U/l, като разликата е статистически значима при $p \leq 0,05$ (Фиг.20). Анализът на дисперсията показва и тук получаване на стесняващ се коридор при

стабилизиране на резултатите (Фиг.21). В контролната група стойностите се задържат високи, като промяната е от $154,16 \pm 10,37$ U/l на $158,42 \pm 11,81$ U/l (Фиг.22), но увеличението няма статистическа достоверност. Коридорът на дисперсия се разширява, не давайки ясна тенденция (Фиг.23).

Изходните начални стойности на първа група и контролната група са $127,64 \pm 5,39$ U/l, респ. $154,16 \pm 10,37$ U/l без достоверна разлика между тях. В края на наблюдавания период окончателните стойности показват достоверно намаление на серумното ниво на алкалната фосфатаза след прилагането на алфакалцидол спрямо контролната група ($p \leq 0,0004$). Началната стойност на алкалната фосфатаза в групата с прием на калцитриол обаче е значително по-висока от тази на контролната група ($267,21 \pm 28,88$ U/l, респ. $154,16 \pm 10,37$ U/l). След въздействие на калцитриол средната стойност на алкалната фосфатаза в края на изследвания период се понижава статистически достоверно на $209,72 \pm 22,31$ U/l при $p \leq 0,05$ (Фиг.20). При сравняване с контролната група се установява достоверна разлика $209,72 \pm 22,31$ U/l vs. $158,42 \pm 11,81$ U/l, която поради гореизложеното приемаме за нерелевантна. Известно основание за последното твърдение дава рандомизацията на наблюдаваните лица в различните групи. За целия период на наблюдението не се установява динамика на стойностите в контролната група, В останалите две групи под въздействие на витамин D-аналози има ясна тенденция за понижаване на стойностите.

Намаляването на серумните нива след приема на алфакалцидол е плавно, с незначително покачване при предпоследното измерване. По сходен начин плавно намаляват стойностите и при приема на калцитриол. При референтни стойности за мъже $53 - 128$ U/l, за жени $42 - 98$ U/l, над 60 г. до 141 U/l, вътрегруповият анализ на нивата показва значителна индивидуална вариабилност, както при отделните изследвани, така и при отделните определяния, т.е. във времето. Достигането на нормални нива в първата група е желан резултат. За втората група с прием на калцитриол, както бе вече разгледано, вероятно при промяна на дозата и/или периода на проследяване ще се достигнат стойности, по-близки до нормата, при съобразяване с нежеланите ефекти на витамин D-суплементиращата терапия. Но и тук намалението на стойностите е статистически достоверно. За намаление на серумното ниво на алкалната фосфатаза при използване на калцитриол в големи дози при лечението на вторичен

хиперпаратиреозидизъм у хемодиализни пациенти съобщават Xu et al., 2013. Увеличени в различна степен серумни нива на алкалната фосфатаза са често срещани при пациентите на диализа с остео дистрофия поради абнормния костен обмен. И като един от биомаркерите за уврежданията на костната минерална плътност при пациенти на диализа, Nybo et al., 2013, определят серумните нива на алкалната фосфатаза, наред със стойностите на ПТХ. Точно тези биомаркери според авторите позволяват добра преценка на костната загуба за кратки периоди от време, методиките са лесно изпълними и бързи. При изследване за сезонни промени на показателите на минералната обмяна при гръцки диализни пациенти Kyritsis et al., 2011, съобщават стойности от $87,2 \pm 68$ до $95,8 \pm 40$ U/l в изследваната група, но на фона на заместителна витамин D-терапия и свързващи фосфора средства поне една година предварително, въпреки, че не намират достоверни сезонни промени в нивата на алкална фосфатаза. В нашето проучване 56% от всички изследвани са с повишени нива на алкална фосфатаза, а още 13% са в горната граница на референтните стойности в началото на проучването. Подобряването на минералната обмяна и костните процеси в резултат на витамин D-суплементираща терапия водят до намаляване, а и до нормализиране и на стойностите на алкалната фосфатаза. В повечето проучвания проследяването на алкалната фосфатаза се извършва ежемесечно, както сме приели и ние. В разработените насоки за добра клинична практика (KDOQI и KDIGO) обаче, отчитането на стойностите на алкална фосфатаза не бе включено в алгоритмите за препоръчително лечение. Получените нови данни за значението на редовното отчитане на нивата на алкалната фосфатаза както за костните процеси, така и в прогнозирането на риска, заболяемостта и смъртността при диализните пациенти доведоха до включване на този показател в последните обсъждания и корекции на препоръките. Mognone et al., 2011, официално препоръчват мониторинг на стойностите на алкалната фосфатаза на всеки 3 до 6 месеца, което можем само да подкрепим. Не на последно място проследяването и повлияването на алкалната фосфатаза е свързано и с ектопичната, особено съдовата, калцификация и възпалението. Narisawa et al., 2007, проучват алкалната фосфатаза като таргет за медикаментозно повлияване и лечение или превенция на ектопичната калцификация. Damera et al., 2011, изследват зависимостта между серумната алкална фосфатаза и повишени стойности

на С-реактивен протеин. Те установяват, че серумната алкална фосфатаза може да бъде маркер на възпалителните процеси. Всичко това още повече разширява значението на алкалната фосфатаза като важен параметър за пациентите на хемодиализа. Необходими обаче са и още много данни от редовното проследяване на пациентите.

В заключение може да се каже, че серумните нива на алкалната фосфатаза намаляват сигнификантно след приема на алфакалцидол и калцитриол за периода на проучването.

6.4. ПТХ

Паратхормонът е един от основните регулатори на минералната обмяна в организма. Нивата на ПТХ, калция и фосфора, а и количеството активен витамин D_3 са взаимно обвързани. Увредената бъбречна функция води до увеличаване на хиперфосфатемията, намалено образуване на активен витамин D_3 , хипокалциемия. В резултат на тези промени в повечето случаи се увеличава дейността на паращитовидните жлези и настъпва вторичен хиперпаратиреоидизъм с увеличение на нивата на ПТХ в кръвта. Съвсем скорошно проучване на Li et al., 2013, установява статистически достоверно, че високите нива на ПТХ при диализните пациенти се съпътстват от хиперфосфатемия и хиперфосфатаземия (повишени стойности на серумната алкална фосфатаза), докато много ниските нива (<100 pg/ml) и много високите нива (≥ 800 pg/ml) на ПТХ се свързват с хиперкалциемия. Ако тези взаимозависимости са причинно-следствени, то корекцията на хиперпаратиреоидизма придобива още по-голямо значение за костните и минерални смущения на хемодиализните пациенти, отбелязват авторите. Стойностите на ПТХ при диализните пациенти са и сигнификантно свързани с повишената смъртност (Drechsler et al., 2011). Според различните автори нива от 400-600 pg/ml са независим рисков фактор за повишена обща смъртност (Block et al., 2004; Young et al., 2005; Kalantar-Zadeh et al., 2006; Tentori et al., 2008; Steddon et al., 2010,). Промените на ПТХ може да са в много широки граници. Препоръчваните таргетни стойности като цел на терапевтичната стратегия, са различни в различните източници - от 150 до 300 pg/ml (National Kidney Foundation, KDOQI, 2003); стойности от 100 до 500 pg/ml (BCRenalAgency 2010); 2-9

пъти над нормалните стойности (от 130 до 570 pg/ml) (KDIGO, 2009) или 2-9 пъти над нормалните стойности обичайни за методиката; стойности до 4 пъти над нормалните (Steddon et al., 2010); стойности 1 до 3 пъти над нормалните (Elder et al., 2006). Проследяване на стойностите на ПТХ се препоръчва на интервали от 3 до 6 месеца (National Kidney Foundation, KDOQI, 2003; KGIGO, Uhlig et al., 2010; Steddon et al., 2010). Greenberg et al., 2011, предлагат ежемесечно проследяване на серумния ПТХ, което в тяхното изследване е свързано с увеличаване броя на пациентите, достигнали препоръчаните стойности за ПТХ. В нашето проучване нивата на ПТХ са измерени в началото на проучването и в края на петия месец. Референтните стойности на използваната от нас лабораторна методика са от 15 до 65 pg/ml. Определянето на интактен ПТХ, както е в нашето проучване, е най-често използвания и утвърден лабораторен метод. Все още няма препоръки за унифициране на методиките при определяне на серумните нива на ПТХ. Установихме, че това затруднява до известна степен сравняването на резултатите при различните изследователи, както отбелязват и Souberbielle et al., 2010. В нашето проучване са проследени промените в средните стойности в началото и в края на периода при двете групи изследвани. И в двете групи при изходните стойности преобладават значително по-високите спрямо нормалните. Вътрегруповото разпределение на стойностите е неравномерно, индивидуалните разлики са големи. В първа група с прием на алфакалцидол с ПТХ до 150 pg/ml са 42,7% (50), с ПТХ от 150 до 300 pg/ml са 31,6% (37), с ПТХ от 300 до 600 pg/ml са 20,5% (24) и с ПТХ над 600 pg/ml са 5,1% (6) от изследваните. Общо за първа група с прием на алфакалцидол средната стойност на ПТХ се променя от $240,41 \pm 20,64$ pg/ml в началото на $154,05 \pm 12,82$ pg/ml в края на изследването (Фиг.24). Намалението е статистически значимо при $p \leq 0,0002$. Във втора група с прием на калцитриол с ПТХ до 150 pg/ml са 20% (3), с ПТХ от 150 до 300 pg/ml са 20% (3), с ПТХ от 300 до 600 pg/ml са 26,6% (4) и с ПТХ над 600 pg/ml са 33,3% (5) от изследваните. Общо за втора група средната стойност на ПТХ се променя от $346,97 \pm 66,88$ pg/ml на $274,06 \pm 55,00$ pg/ml (Фиг.25). Има видима тенденция към намаление, обаче не се достигат статистически значими стойности ($p \leq 0,2$). Нивата на ПТХ във втората група са общо по-високи. Най-вероятно е намалението да достигне сигнификантна стойност при повишение на дозата на

калцитриола. Това предположение се подкрепя и от вътрегруповия анализ на стойностите. В 46% от изследваните има понижаване на стойностите на ПТХ в различна степен. При един пациент има понижаване, но и двете нива са значително по-високи от тези на останалите (от 1766 на 1050 pg/ml, спрямо средните за групата стойности от $346,97 \pm 66,88$ на $274,06 \pm 55,0$ pg/ml). Резултатите от проучванията на други автори не са идентични. Gu et al., 2005, потвърждават добрите и сигурни ефекти на алфакалцидола при вторичния хиперпаратиреоидизъм при диализни пациенти, като установяват по-голяма ефективност на пероралната пулсова терапия спрямо ежедневния прием при умерен хиперпаратиреоидизъм. Нашите резултати се подкрепят от техните изводи. Подобни са и изводите на Brandi, 2008, която също установява в серия изследвания как алфакалцидол понижаване и стабилизира нивата на ПТХ краткосрочно и дългосрочно, а опасността от хиперкалциемия може да се избегне чрез стриктно проследяване на плазмените калциеви нива и съответстващо коригиране на дозата на алфакалцидол. Hansen, 2012, в сравнително проучване също подкрепя прилагането на алфакалцидол за лечение на смущенията в минералния метаболизъм при диализни пациенти. Освен това той предполага, че ефектът на алфакалцидол е независим от базалното ниво на ПТХ. И в нашето проучване алфакалцидол доведе до намаляване и стабилизиране на нивата на ПТХ при много различни изходни стойности. В сравнително изследване Hayashi et al., 2004, потвърждават намаляването на серумния ПТХ, повишаване на серумния калций и незначителни промени в серумния фосфор при прилагане на калцитриол. Xu et al., 2013, намират понижаване на нивата на ПТХ при използване на калцитриол в големи дози при вторичен хиперпаратиреоидизъм у хемодиализни пациенти.

В заключение може да се каже, че приемът на алфакалцидол води до сигнификантно понижаване на нивата на паратиреоидния хормон за периода на проучването при хемодиализните пациенти. Приемът на калцитриол показва тенденция, без достигане обаче на сигнификантни стойности, за понижаване на нивата на ПТХ в използваната доза за периода на наблюдение.

6Б. Острофазови маркери на възпалението

В специализираната литература през последните десет години има съобщения на различни автори за повишен инфламаторен статус при

пациенти на диализно лечение. Възпалението при хемодиализните пациенти е често срещано и има мултифакторна генеза. Причините са свързани с всеки отделен елемент от хемодиализната процедура – от съдовия достъп, през биосъвместимостта на мембраните и материалите, до чистотата на водата, а така също и с коморбидността при ХБЗ. Същевременно, както бе вече разгледано, то е и много важен прогностичен рисков фактор за заболяемост, а и за обща и сърдечно-съдова смъртност в тази популация пациенти. Затова е обоснована нуждата от повече знания за различните маркери на възпалението

6.5. С-реактивен протеин

С-реактивният протеин е признат архетипен острофазов маркер на възпалението. Системното му измерване го прави и важен прогностичен фактор за състоянието на пациентите и очаквани бъдещи промени. В настоящото проучване са определяни серумните стойности на С-реактивния протеин в началото и на третия месец от включване на аналозите на витамин D. Лабораторните методи са утвърдени през последните години и са достъпни. При включените в изследването лица няма данни за възпалителни заболявания при започване на проучването. При групата с прием на Алфакалцидол нивото на С-реактивен протеин се променя от $1,43 \pm 0,54$ mg/l на $6,72 \pm 2,90$ mg/l (Фиг.26). Според T-test промяната е достоверна при гранични стойности ($p \leq 0,047$), тест чрез ANOVA не подкрепя убедително увеличението. И при двете групи анализирани стойности, С-реактивен протеин е основно в рамките на референтните стойности. Поради високата стойност на стандартното отклонение и в двете групи, приемаме, че няма достоверно повишаване на нивото на С-реактивен протеин. Статистически недостоверното повишаване на средното ниво на С-реактивен протеин на третия месец се дължи по-скоро на единични случаи и други причини, извън изследователския дизайн. При вътрегрупов анализ на отделните стойности, при двама от пациентите повишените стойности са най-вероятно в резултат на остро интеркурентно заболяване, съвпадащо по време с определянето на ниво на С-реактивен протеин, а не поради проблем с активацията на вътрешните системи при медикаментозно въздействие или лоша биосъвместимост. При групата с прием на калцитриол нивото

на С-реактивен протеин се променя от $7,32 \pm 2,36$ mg/l на $10,21 \pm 5,03$ mg/l (Фиг.27). При $p \leq 0,30$ обаче тази промяна не е статистически достоверна и не се подкрепя убедително според използваните тестове. При анализиране на отделните резултати се оказва, че при един пациент има значително повишение на нивото на С-реактивен протеин ($62,4$ mg/l), насочен е за уточнение и допълнителна терапия. Сравнение и между средните стойности на нивата на С-реактивен протеин показва, че няма значима разлика между двете групи ($p \leq 0,27$). Данните за стойностите на С-реактивния протеин от различни проучванията не са еднозначни. При използваната от нас лабораторна методика референтната стойност е при ниво на С-реактивен протеин ≤ 6 mg/l. Освен клиничната находка, Panichi et al., 2006, приемат за повишени нива над 5 mg/l, а Razeghi et al., 2008, приемат за повишени нива над 10 mg/l. Hung et al., 2008, отбелязват липсата на консенсус за cut off-нивото на С-реактивен протеин, използвани при дефиниране на възпалението при ХБЗ 5-ти стадий. Насоките за добра практика K/DOQI (National Kidney Foundation, K/DOQI 2005) само предлагат дефиниране на възпаление при нива на С-реактивен протеин $>5-10$ mg/l, като също препоръчват още проучвания за определяне на оптималните стойности на С-реактивен протеин, свързани с риска от заболяемост и смъртност при кардиоваскуларните увреждания при тези пациенти. Kawaguchi et al., 2011, установяват сигнификантно по-висок риск от смъртност при диализни пациенти при С-реактивен протеин >3 mg/l, като подобни ниски стойности се срещат рядко в други проучвания. Както отбелязват Yamamoto et al., 2013, поради механизма си на синтез и освобождаване, нивото на С-реактивен протеин не се променя в хода на една диализна процедура. От една страна, самата диализа предизвиква инфламаторен отговор, но С-реактивен протеин се повишава след 6 часа, с пик обикновено 24 часа след тъканно увреждане, а продължителността на диализната процедура е не повече от 4-5 часа. Това е и една от причините единични определяния на С-реактивен протеин да имат по-малка прогностична стойност според повечето изследователи, потвърдена и от Meuwese et al., 2011. Veerenhout, 2003, проследявайки тримесечен интервал, установява значителни индивидуални вариации в стойностите на С-реактивен протеин, но също подкрепя твърдението, че нива над 10 mg/l са пряко свързани с повишена коморбидност. Разглеждането на индивидуалните стойности на нашата

група изследвани показва също разлики при отделните пациенти. Поради дисперсията на стойностите и наличието на отделни по-високи нива, общо не се отчита статистически достоверна промяна. Липсата на промяна може да означава също, че няма манифестно влошаване на инфламаторния статус. Следователно не се очаква увеличаване на кардиоваскуларния риск при пациентите за този период. Показателно е и че при част от изследваните нивото на С-реактивния протеин се намалява. Не всички реагират в еднаква степен както на диализното лечение, така и на заместителната витамин D-терапия. Подобни резултати се подкрепят и от Wu et al., 2011, които установяват понижаване на нивото на С-реактивния протеин само в част от обследваните от тях пациенти. Тук не на последно място може да се обсъждат и доза и продължителност на прием на аналозите на витамин D, защото ефектите са доза-зависими и се променят във времето. Редовното (поне) ежемесечно проследяване на С-реактивен протеин за продължителен период от време дава възможност за по-точно дозиране на лечението – както на аналози на витамин D, така и на параметрите на диализната процедура, противовъзпалителни, други медикаменти. Повишени стойности, открити при рутинно проследяване, дават възможност за своевременно терапевтично поведение, по-бърза реакция, а и открояване на по-рисковите пациенти.

Нееднозначните резултати се свързват вероятно и с факта, че има все още много неясни моменти в знанията ни както за механизмите на антиинфламаторния ефект на витамин D, така и за всички конкретни причини за повишения С-реактивен протеин при диализното лечение. Освен това има данни, че самият С-реактивен протеин, когато е в големи количества участва във формирането и развитието на атеросклеротичните лезии, т.е. освен маркер, е и медиатор при атеротромботични увреждания, което увеличава значението на продължаващите проучвания (Nasri, 2012). Предлагат се различни хипотези, които се усложняват и променят в зависимост от откриването на рецептори за витамин D и наличие на 1 α -хидроксилаза във все повече тъкани и клетки. Ефектите при проучванията са доза-зависими, като значителен противовъзпалителен ефект се постига при по-високи дози на витамин D. В реални условия при лечение на пациенти обаче има лимитиране, защото високите дози могат да имат негативен ефект върху минералния метаболизъм, като хиперкалцеимия, намалена костна плътност, мекотъканна калцификация, т.е. терапевтичният

„прозорец” не е широк. Затова целта е прилагане в практиката на такава витамин D суплементираща терапия, че да се избегнат тези странични ефекти, но и да се реализират „нетипичните” ефекти (противовъзпалителен, имуномодулаторен, евентуално антитуморен). (DeLuca et al., 2001; Panichi et al., 2003; Guillot et al., 2010; Albar, 2010; Zhang et al., 2012; Sung et al., 2013). Тази задача е усложнена още повече и поради диализното лечение, но с продължаващите непрекъснато изследвания, обхващащи все повече пациенти, се натрупват данни, които улесняват решението ѝ.

В заключение може да се каже, че при направеното проучване с прилагане на алфакалцидол и калцитриол в терапевтични дози за лечение на реналната остеодисτροφия няма повишение в серумните нива на С-реактивен протеин.

Необходими са по-нататъшни проучвания с повече изследвани лица и за по-дълъг период от време за установяване динамиката в серумните нива на С-реактивния протеин при лечение с аналози на витамин D.

6.6. Бета₂-микроглобулин

В настоящото проучване бета₂-микроглобулинът е включен като острофазов маркер на възпалението. Нивата в серума при болните с ХБЗ са обект на специален интерес, защото натрупвания от бета₂-микроглобулин са и в основата на диализно-свързаната амилоидоза. Това е усложнение, което може да се прояви след по-дълъг период на диализно лечение. Протича с различна степен на изявеност на основно костно-ставните увреждания. При възпалителни реакции се повишава генерацията и отделянето на бета₂-микроглобулин в серума. Отстраняването му е затруднено поради увредената бъбречна функция. В двете изследвани групи средната продължителност на диализно лечение е 5 г 4 мес., съответно 4 г 1 м., и началните изследвани нива на бета₂-микроглобулин не са значително увеличени. Трябва да се има предвид, че увеличението може да е до 60 пъти над нормалното ниво при пациенти с ХБЗ на продължително диализно лечение (Floege et al., 1996). При групата с прием на Алфакалцидол средните серумни нива намаляват от 4,72±0,09 mg/l на 4,42±0,12 mg/l (Фиг.28), като промяната е сигнификантна ($p \leq 0,03$). При групата с прием на Калцитриол серумните нива намаляват от 9,83±0,14 mg/l на 5,59±0,47 mg/l (Фиг.29), промяната

е сигнификантна ($p \leq 0,0001$). При сравнение на крайните средни нива на бета₂-микроглобулин се установява статистически убедителна ($p \leq 0,01$) пониска стойност при групата с Алфакалцидол ($4,42 \pm 0,12$ mg/l), в сравнение с тези на групата с Калцитриол ($5,59 \pm 0,47$ mg/l). Поначало при отпадане на бъбречната функция нивата на бета₂-микроглобулин се повишават. При норма до $2,2$ mg/l, или до 3 mg/l след 60-год. възраст, при измерените тук начални стойности нивата му са повишени от 2 до 5 пъти. Използваните low flux мембрани не го филтрират поради големината на молекулата. Това се използва за сравняване на различни мембрани и методи на екстракорпорално очистване на кръвта (Mandolfo et al., 2006). Използвайки също само low flux мембрани и при подобна средна продължителност на диализиране Mumtaz et al., 2010, установяват средни стойности от $92,6$ mg/l.

При последното ни измерване в рамките на проучването нивата са повишени по-слабо (от $1,7$ до $4,1$ пъти над нормата). Промените са сигнификантни, докато промените в нивото на другия острофазов маркер С-реактивен протеин не са. Rahbar et al., 2012, също установява, че няма статистически достоверна взаимозависимост между промени в нивата на бета₂-микроглобулин и С-реактивен протеин. Използването на low flux мембрани само по себе си може да е причина за повишените нива. Бикарбонатната диализа, както е при нашето проучване, а също и степента на чистота на водата за диализния разтвор, са фактори, ограничаващи амилоидозата, отбелязват също и Arizono et al., 2004. Макар и малко, намалението на бета₂-микроглобулин и при двете групи (с $0,3$ mg/l за първа група, и с $2,24$ mg/l за втора група) е интересен резултат. Той трудно може да бъде обяснен с една конкретна причина на фона на многобройните, взаимно свързани или не, фактори при диализното лечение. Постоянно разширяващите се знания за ролята на витамин D, особено в процесите на възпалението и имунитета, ще спомогнат за определяне на оптимална витамин D суплементираща терапия и като възможност за повлияване на стойностите на бета₂-микроглобулина. Необходими са допълнителни проучвания, фокусирани и върху други маркери на възпалението, а и върху по-голям брой изследвани, които да бъдат анализирани в корелация с бета₂-микроглобулина. В тази връзка са изключително интересни и резултатите на Bellini et al., 2014, въпреки че нивата в тяхното проучване са значително по-високи. Те установяват сходни стойности на бета₂-микроглобулин при

диализни пациенти с изявена симптоматика на ставна амилоидоза и при асимптомната група. Данните от литературата, обсъждани от авторите, са противоречиви. Основен извод и при тях е нуждата от допълнително проучване, защото коректното използване на биохимичните резултати трябва да е свързано с клиничните данни, и да служи както за определяне на сигнификантни стойности, така и за първа стъпка по посока на по-широки проучвания. В последно време интересът към създаване на широка база данни за стойностите на бета₂-микроглобулин при бъбречните увреждания във всички стадии се увеличава и поради факта, че се установява достоверна зависимост между нивата на бета₂-микроглобулин и кардиоваскуларната заболеваемост при уремични пациенти, както и значението му като прогностичен фактор за смъртност при диализни пациенти, обща и кардиоваскуларна, (Cheung et al., 2006; Liabeuf et al., 2012) при обследване на данните от голям брой пациенти. Освен това има данни и за доза-зависимо директно стимулиране на остеокластна активност от бета₂-микроглобулин (Menaar et al., 2008) при напредването на диализно-свързаната амилоидоза.

Системното редовно определяне на бета₂-микроглобулин спомага за прецизиране на терапевтичното поведение. Само проследяване на промените на стойностите му в по-голям брой изследвани и за по-дълъг период от време може да потвърди дали анализите на витамин D имат евентуално понижаващо влияние върху нивата на бета₂-микроглобулин при болни на диализно лечение.

В заключение може да се каже, че разликата в нивата е малка по абсолютна стойност, но това се дължи и на ниските изходни стойности на бета₂-микроглобулин. Този факт сам по себе си говори за качеството на медицинските грижи за пациентите в проучваните групи. Статистически сигнификантната динамика на серумните нива вътре във всяка група и разликите между двете групи са много обнадеждаващи. Това означава, че трябва да се подхожда с особено внимание към витамин D суплементиращата терапия.

Анализите на витамин D алфакалцидол и калцитриол са надеждна възможност при изследване на калциево-фосфорната обмяна и постигане на регулаторни ефекти при нейното нарушение.

7. ОСНОВНИ ИЗВОДИ

- 7.1. Под въздействие на алфакалцидол в така приложените дози:
- серумните нива на калций се повишават и задържат до нормални стойности, като промяната е статистически достоверна;
 - серумните нива на алкална фосфатаза се понижават статистически достоверно;
 - серумните нива на паратхормон се понижават статистически достоверно;
 - серумните нива на фосфор не показват статистически достоверна промяна.
- 7.2. Под въздействие на калцитриол в така приложените дози:
- серумните нива на калций и фосфор не се променят сигнификантно;
 - серумните нива на алкална фосфатаза се понижават;
 - серумните нива на паратхормон не се променят .
- 7.3. Под въздействие на алфакалцидол, както и под въздействие на калцитриол
- серумните нива на С-реактивен протеин не се променят;
 - серумните нива на бета₂-микроглобулин се понижават.
- 7.4. В контролната група без въздействие на алфакалцидол и без въздействие на калцитриол не се установяват значими промени в стойностите на серумните калций, фосфор и алкална фосфатаза.
- 7.5. Анализите на витамин D алфакалцидол и калцитриол са надеждна възможност за изследване на калциево-фосфорната обмяна и за постигане на регулаторни ефекти при нейното нарушение.

8. ОБОБЩЕНИЕ

Успешно е осъществено петмесечно проучване на регулаторните ефекти на аналози на витамин D върху калциево-фосфорната обмяна при заместване на бъбречната функция с хемодиализа. В рамките на стабилен изследователски модел при 186 лица са наблюдавани регулаторните ефекти на два различни аналога на витамин D. Това са алфакалцидол и калцитриол. Направено е сравнение между регулаторни ефекти на двата витамин D аналога. Наблюдаваните ефекти са сравнени с параметрите на група лица, които също са на заместителна терапия на бъбречната функция с диализа, но не са под въздействие на витамин D-derivati за същия петмесечен период на наблюдение. Тези лица са обобщени в контролна група от 23 лица.

Установени са сигнификантни промени в наблюдаваните параметри калций, алкална фосфатаза, паратхормон и бета2-микроглобулин под въздействие на алфакалцидол.

В различна степен са установени промени в наблюдаваните параметри калций, алкална фосфатаза, паратхормон и бета2-микроглобулин и под въздействието на калцитриол.

Двете групи показват ясна тенденция на различие при сравняване с контролната група, при която не се наблюдават никакви ефекти.

В някои параметри не е установена ясна и стабилна тенденция в резултат на въздействията.

Дефиниран е работещ модел за изследване на регулаторните ефекти по въздействие на витамин D-derivati.

Направеното проучване дава нови знания за регулаторните ефекти на различни витамин D-derivati.

Придобити са и нови знания за допълнителните ефекти на тези derivati, които се обобщават с понятието плеiotропни ефекти.

При други параметри не се наблюдава ясна тенденция доказваща регулаторни ефекти под въздействие на витамин D-derivati, нито в посока на повишена, нито в посока на понижени регулация. Уместно е проучването да бъде продължено с по големи групи наблюдавани лица и за по-продължителен период на наблюдение.

Получените резултати от проведеното петмесечно проучване дават нови знания и възможности за повлияване на физиологичните процеси. Придобити са и нови знания за регулацията и взаимозависимостите на вътрешните системи на организма при осигуряване на хомеостазата.

9. СПРАВКА ЗА ОСНОВНИТЕ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Приноси с научно-теоретичен характер:
 - 1.1. Направен е подробен обзор на съвременните знания за различните патогенетични механизми при нарушение на минералната обмяна настъпващи у болни с хронични бъбречни заболявания;
 - 1.2. Направен е обзор на клиничните прояви породени от нарушение на минералната обмяна при болни с хронични бъбречни заболявания;
 - 1.3. Направен е подробен обзор на актуалните знания за плейотропните ефекти на витамин D-дериватите;
 - 1.4. Направено е обобщение на съвременните възможности за суплементация с витамин D-деривати;
2. Приноси с научно-експериментален характер:
 - 2.1. Дефиниран е изследователски модел за проучване на регулаторните ефекти на аналози на витамин D върху калциево-фосфорната обмяна;
3. Приноси с оригинален научно-изследователски характер:
 - 3.1. Осъществено е проучване на регулаторните ефекти на алфакалцидол върху калциево-фосфорната обмяна. Според проведеното задълбочено търсене в достъпната литература това се прави за първи път у нас;
 - 3.2. Осъществено е сравнително проучване на регулаторните ефекти на алфакалцидол и калцитриол върху калциево-фосфорната обмяна. Според проведеното задълбочено литературно търсене това се прави за първи път у нас;
 - 3.3. Осъществено е проучване на плейотропните ефекти на алфакалцидол върху други органи и системи. Според проведеното задълбочено търсене в достъпната литература това се прави за първи път у нас;
 - 3.4. Осъществено е сравнително проучване на плейотропните ефекти на алфакалцидол и калцитриол върху някои други органи и системи. Според проведеното задълбочено литературно търсене това се прави за първи път у нас;

4. Приноси с приложен и практически характер
 - 4.1. Приложен е стабилен модел за проучване на калциево-фосфорната обмяна при лица с липсващ или нисък синтез на витамин D;
 - 4.2. Осъществен е ефективен модел на взаимодействие на предклиничната с клиничната медицина за провеждане на научни изследвания;
 - 4.3. Осъществен е модел за проучване на физиологичната регулация в условията на заместване на липсваща биологична функция с изкуствени органи.

ДЕКЛАРАЦИЯ

за оригиналност по чл. 27, ал. 2 от ППЗРАСРБ

от д-р Любка Юриева Дечева-Икономова

докторант на самостоятелна подготовка

Декларирам, че представеният от мен дисертационен труд на
тема:

„Проучване на регулаторните ефекти на аналози на витамин
D върху калциево-фосфорната обмяна при заместване на
бъбречната функция ”

е оригинална научно-приложна разработка и не е част от
колективен труд.

Дата:

.....

Декларатор:

22.06.2014г.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА

1. Дечева Л, Стоянов З, Паскалев Д, Икономов В. Въздействие на витамин Д – анализи върху острофазови маркери при ХБЗ V ст. Известия на Съюза на учените – Варна, Серия „Медицина и екология”. 2013;18(2):3-6.
2. Дечева Л, Стоянов З, Иванова М, Пашалиева И, Николова П, Станчева Е. Калциево – фосфорна обмяна при стабилен модел с липсваща бъбречна функция. Известия на Съюза на учените – Варна, Серия „Медицина и екология”. 2012;17(доп. 1):21-24.
3. Дечева Л, Икономов В. Съвременни аналози на витамин D в лечението на бъбречната костна болест. Медицина и фармация. 2008;V,39:28-29.

Участия

1. Дечева Л, Стоянов З, Паскалев Д, Икономов В. Въздействие на витамин Д – анализи върху острофазови маркери при ХБЗ V ст. Заключителна конференция „Науката в служба на обществото”, 25.10.2013; Месец на науката – Варна, 2013.
4. Дечева Л, Икономов В, Ненов К, Паскалев Д. Влияние на алфакалцидол върху реналната остеопатия при болни на диализно лечение. IX Национален конгрес на Българското дружество по физиологични науки, 9-11 ноември 2007 г., Благоевград.
5. Decheva L. Analogues of Vit.D – regulatory activities on mineral metabolism during replacement of renal function as an in vivo experimental model. VI National Congress of Pharmacology, 1-4 October 2009. Journalist Hotel, Golden Sands.
6. Decheva L, Ikononov V. Regulatory effects of Alfacalcidol on Ca and iPTH in renal osteopathy. American Society of Nephrology 50th Annual meeting ASN, November 4-9, 2008, Philadelphia, PA, USA.