

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ - СОФИЯ  
УНИВЕРСИТЕТСКА МНОГОПРОФИЛНА БОЛНИЦА  
ЗА АКТИВНО ЛЕЧЕНИЕ „АЛЕКСАНДРОВСКА”

ВИТАМИН Д И БЪБРЕЧНА ТРАНПЛАНТАЦИЯ

Д-р Жан Жанов Филипов

асистент

София, 2014

1. Използвани съкращения.....	7
2. Увод.....	8
3. Литературен обзор .....	9
3.1.  Обща част .....	9
3.1.1. Синтез на витамин Д.....	9
3.1.2. Методи за определяне на ВД в серум / плазма.....	15
3.2. Патологични отклонения в статуса на ВД.....	17
3.2.1. Намален кожен синтез .....	23
3.2.2. Намалена бионаличност.....	24
3.2.3. Неадекватен хранителен внос .....	27
3.2.4. Увеличен катаболизъм на 25ВД.....	28
3.2.5. Намален синтез на 25ВД.....	29
3.2.6. ВД метаболизъм при ХБЗ и нефозен синдром .....	29
3.2.7. Наследствени дефекти в метаболизма на ВД .....	31
3.2.8. Нарушения във ВД метаболизма при други придобити заболявания .....	32
3.3. Значение на ВД – класически и плейотропни ефекти .....	33
3.3.1. Повлияване на РААС .....	33
3.3.2. Сърдечносъдова система и ВД.....	35
3.3.3. Ренопротекция .....	35
3.3.4. Захарен диабет, метаболитен синдром и ВД .....	36
3.3.5. ВД статус и имунитет.....	37
3.3.6. Противотуморна активност на ВД.....	38
3.3.7. Други ефекти на ВД .....	39
3.4. Витамин Д и бъбречна трансплантация .....	40
3.4.1.  Нарушения във ВД статуса при БТ.....	40
3.4.2. Значение на ВД при пациенти с бъбречна трансплантация .....	41
4. Цел. Задачи. ....	45
4.1. Цел .....	45
4.2. Задачи .....	45
5. Материали и методи .....	46
5.1. Материали .....	46
5.1.1. Подбор на пациентите.....	46
5.1.2. Подбор на детерминантите на 25ВД .....	46

5.1.3.Подбор на състоянията, повлиявани от ВД .....	48
5.2. Методи.....	49
5.2.1. Изследване на 25ВД в плазма чрез валидизиран LC-MS/LCметод.....	49
5.2.2. Определяне нивото на имуносупресорните медикаменти в кръв по LC-MS/LCметод.....	49
5.2.3. Изследване на кръвни и уринни показатели, определяне на бъбречна функция .....	50
5.2.4. Микробиологични изследвания .....	50
5.2.5. Оценка на ИТМ.....	50
5.2.6.Статистически анализ .....	51
<b>6. Собствени проучвания.....</b>	<b>51</b>
6.1.Основни показатели на общата популация от изследвани болни .....	51
6.1.1.Демографски данни.....	52
6.1.2.Лабораторни данни.....	52
6.1.3.Имуносупресивна терапия.....	53
6.1.4. ВД статус на пациентите с БТ .....	55
6.1.5.ВД суплементация .....	55
6.1.6. Съпътстващи заболявания .....	57
6.1.7.Заклучение.....	57
6.2. ВД статус на селектираните пациенти с БТ .....	58
6.2.1. Общи данни.....	58
6.2.2. Честота на ВД недостатъчност.....	61
6.2.3. Заклучение.....	64
6.3.Фактори влияещи на нивото на 25ВД в различни периоди след БТ .....	64
6.3.1. Резултати от регресионен анализ: давност на БТ над 6 месеца .....	65
6.3.2. Резултати от регресионен анализ давност на БТ над 12 месеца .....	66
6.3.3.Резултати от регресионен анализ: давност на БТ над 36 месеца .....	68
6.3.4. Резултати от регресионен анализ: давност на БТ над 60 месеца .....	71
6.3.5. Резултати от регресионен анализ: БТ с давност над 120 месеца .....	73
6.3.6. Заклучение.....	75
6.4.Влияние на пола върху 25ВД при БТ .....	79
6.4.1. Резултати .....	79
6.4.2. Заклучение.....	83
6.5. Влияние на сезонността върху ВД статуса при пациенти след БТ.....	85
6.5.1. Селекция на пациентите и резултати.....	85
6.5.2. Фактори, влияещи на сезонният спад на 25ВД при пациентите с БТ .....	92
6.5.3. Заклучение.....	93
6.6. Влияние на ИТМ върху ВД статуса при пациенти с БТ .....	94
6.6.1.Разпределение на пациентите с различна давност на БТ според ИТМ.....	94
6.6.2. Заклучение.....	98
6.7. Влияние на ЗД върху ВД статуса при пациенти с БТ .....	105
6.7.1. Подбор на пациентите – давност на БТ над 6 месеца .....	105
6.7.2. Резултати – пациенти с БТ над 6 месеца. ....	106
6.7.3. Резултати при пациенти с БТ над 12 месеца.....	107
6.7.4. Заклучение.....	109

6.8. Влияние на имуносупресивната терапия върху 25ВД .....	110
6.8.1. Имуносупресори и 25ВД при пациенти с давност на БТ над 6 месеца.....	110
6.8.2. Имуносупресори и 25ВД при пациенти с БТ, давност над 60 месеца.....	113
6.8.3. Заключение.....	117
6.9. Влияние на ВД върху протеинурията.....	117
6.9.1. Влияние на 25ВД върху протеинурията при пациенти с давност на БТ над 6 месеца .....	117
6.9.2. Влияние на ВД върху протеинурията при пациенти с давност на БТ над 12 месеца .....	119
6.9.3. Влияние на ВД върху протеинурията при давност на БТ над 36 месеца.....	121
6.9.4. Влияние на ВД върху протеинурията при пациенти с БТ над 60 месеца .....	122
6.9.5. Влияние на ВД върху протеинурията при пациенти с БТ над 120 месеца ....	123
6.9.6. Заключение.....	126
6.10. Влияние на ВД върху честотата на неоплазии при пациенти след бъбречна трансплантация .....	126
6.10.1 Влияние на ВД върху честотата на неоплазии при пациенти с давност на БТ над 6 месеца .....	127
6.10.2. Влияние на ВД върху честотата на неоплазии при пациенти с давност на БТ над 12 месеца .....	129
6.10.3. Влияние на ВД върху честотата на неоплазии при пациенти с давност на БТ над 36 месеца .....	131
6.10.4. Влияние на ВД върху честотата на неоплезии при пациенти с давност на БТ над 60 месеца .....	133
6.10.5. Влияние на ВД върху честотата на неоплазии при пациенти с давност на БТ над 120 месеца .....	134
6.10.6 Заключение.....	136
6.11. Влияние на ВД върху честотата на уроинфекции след бъбречна трансплантация .....	139
6.11.1. Влияние на ВД върху честотата на хронични уроинфекции при пациенти с давност на БТ над 6 месеца .....	139
6.11.2. Влияние на ВД върху честотата на хронични уроинфекции при пациенти с давност на БТ над 12 месеца .....	140
6.11.3. Влияние на ВД върху честотата на хронични уроинфекции при пациенти с давност на БТ над 36 месеца .....	142
6.11.4. Влияние на ВД върху честотата на хронични уроинфекции при пациенти с давност на БТ над 60 месеца .....	143
6.11.5. Влияние на ВД върху честотата на хронични уроинфекции при пациенти с давност на БТ над 120 месеца .....	144
6.11.6. Заключение.....	146
6.12. Влияние на ВД върху честотата на реакциите на отхвърляне след БТ.....	147
6.12.1. Влияние на ВД върху честотата на РО при пациентите с давност на БТ над 6 месеца .....	147
6.12.2. Влияние на ВД върху честотата на РО при пациентите с давност на БТ над 12 месеца .....	148
6.12.3. Влияние на ВД върху честотата на РО при пациентите с давност на БТ над 36 месеца .....	150

6.12.4. Влияние на ВД върху честотата на РО при пациентите с давност на БТ над 60 месеца .....	151
6.12.5. Влияние на ВД върху честотата на РО при пациентите с давност на БТ над 120 месеца .....	153
6.12.6. Заключение.....	154
6.13. Влияние на ВД върху общата смъртност след бъбречна трансплантация .....	157
6.13.1. Влияние на ВД върху ОС при пациентите с давност на БТ над 6 месеца ...	157
6.13.2. Влияние на ВД върху ОС при пациентите с давност на БТ над 12 месеца .	159
6.13.3. Влияние на ВД върху ОС при пациентите с давност на БТ над 36 месеца .	160
6.13.4. Влияние на ВД върху ОС при пациентите с давност на БТ над 60 месеца .	162
6.13.5. Влияние на ВД върху ОС при пациентите с давност на БТ над 120 месеца	163
6.13.6. Заключение.....	165
6.14. Терапевтични методи, влияещи на ВД статуса при пациенти с БТ .....	168
6.14.1. Разлика във ВД статуса при пациентите с и без ВД суплементация - обща група бъбречнотрансплантирани .....	168
6.14.2. ВД суплементация, лечение с ВД аналози и активен ВД в селектираната група пациенти, n=289 .....	169
6.14.3. Заключение.....	173
7. Изводи .....	175
8. Приноси .....	178
9. Публикации, свързани с дисертационният труд	179
10. Участия в национални конференции и конгреси	180
11. Международни участия .....	181
12. Библиография .....	182

*Настоящият труд посвещавам на родителите ми*

# 1. Използвани съкращения

## *Съкращения на български език*

1,25ВД – 1,25 дихидрокси витамин Д  
25ВД – 25-хидрокси витамин Д  
Аза – Азатиоприн  
АН – артериално налягане  
АСЕи - инхибитори на ангиотензин I  
конвертиращият ензим  
АРБ - блокери на рецептора за ангио-  
тензин II  
БМК – блокери на калциеви канали  
БТ – бъбречна трансплантация  
ВД – витамин Д  
ВД<sub>2</sub> – витамин Д<sub>2</sub>  
ВД<sub>3</sub> – витамин Д<sub>3</sub>  
ВДР – витамин Д рецептор  
ВДРА – Витамин Д рецепторен активатор  
ВДРЕ – Витамин Д реагиращи елементи  
ВДСП – Витамин Д свързващ протеин  
ДБТ – диспансер по Бъбречна Транс-  
плантация  
Еве - еверолимус  
ЗД – захарен диабет  
ИТМ – индекс телесна маса  
КНИ – калциевринови инхибитори  
КС- кортикостероиди  
Мико – микофенолати  
ММФ - микофенолат мофетил  
Нео - неоплазия  
НФ – нуклеотиден фактор  
ПТХ – паратхормон  
РААС – ренин ангиотензин алдостеро-  
нова система  
РО – реакция на отхвърляне  
РХР – ретиноид X рецептор  
РПХ – рецептор за прегнан Х

Сиро - Сиरोлимус  
СЛЕ – Системен лупус еритематодес  
ССЗ - сърдечно-съдови заболявания  
ССС – сърдечно-съдови заболявания  
ТАК – такролимус  
УроИ - уроинфекция  
ХБЗ - хронично бъбречно заболяване  
ЦНС - централна нервна система  
ЦсА - Циклоспорин А

## *Използвани съкращения на английски език*

CYP27A1 – 25 - хидроксилаза  
CYP27B1 - 1 $\alpha$  - хидроксилаза  
FGF23 – Fibroblast growth factor 23  
/Фибробластен растежен фактор 23  
HLPC – високоефективна течна хрома-  
тография  
KDIGO – Kidney Disease/Improving  
Global Outcomes  
LC-MS/MS - течна хроматография и  
мас-спектрометрична детекция  
mTORI – mTOR-инхибитори  
NHANES – Национално изследване на  
здравето и храненето на САЩ  
NODAT – Новооткрит ЗД след БТ  
SPF – слънцезащитен фактор  
Th<sub>1/2</sub> – Т хелперни клетки тип 1/2  
UVB лъчи – ултравиолетови лъчи тип В

## 2. Увод

Витамин Д (ВД) и метаболите му представляват хормони и хормон-ни прекурсори, които се синтезират ендогенно – в кожата или се приемат от околната среда. Под влияние на ултравиолето-вите лъчи от слънцето 7-дехидроксихолестерол (провитамин Д) се трансформира в дермиса до превитамин Д, който под влияние на телесната температура изомеризира до ВД<sub>3</sub> (холекалциферол). Освен синтез в кожата, ВД се набавя и с храненето, като хранителният прием отговаря за около 10% от общото количество витамин Д в организма. Източник на витамин Д<sub>2</sub> (ергокалциферол, ВД<sub>2</sub>) са предимно растителни продукти, докато на витамин Д<sub>3</sub> – животински продукти – млечни храни, рибно масло, яйчен жълтък. Метаболитите на ВД<sub>2</sub> и ВД<sub>3</sub> са с еквивалентна биологична активност и ефективност.

ВД е липофилна субстанция и след образуването в кожата или чревната резорбция попада в кръвообращението свързана с витамин Д – свързващ протеин (ВДСП), който пренася ВД до черният дроб, където под влияние на ензима 25 – хидроксилаза (CYP27A1) се трансформира до 25-хидроксивитамин Д (калцидиол, 25ВД). ВДСП пренася всички метаболити на ВД, но най – висок афинитет има към 25ВД. Основна роля на ВДСП е да поддържа стабилни резерви на ВД в организма. Следващата стъпка в активирането на ВД е хидроксилиране от ензима 1 $\alpha$  – хидроксилаза (CYP27B1) до 1,25 дихидроксивитамин Д (калцитриол, 1,25ВД), който представлява активният метаболит. Това става основно в тубулните клетки на бъбреците, но още и в клетки на плацентата, пара-щитовидни клетки, макрофаги, кардиомиоцити, грануломатозни клетки при саркоидоза, туберкулоза. Инактивацията на калцитриол става с допълнително хидроксилиране чрез ензима 24-хидроксилаза, който се локализира в редица тъкани.

1,25 ВД осъществява своите ефекти чрез свързване с рецептора за ВД (ВДР), който представлява ядрен рецептор, принадлежащ на семейството на ядрени рецептори, към които се включват още рецепторът за рет-инова киселина, рецепторът за тиреоиден хормон и др. Комплексът ВД – ВДР образува хетеродимер с рецептора за ретиноид X, който се свързва с определени ДНК последователности, което води до експресия на та-ргентни гени. Активирането на ВДР може да доведе до потискане на гени чрез потискане на генна експресия или синтез на белтъци потискащи транскрипцията.

ВДР е широко разпространен в тялото. Взаимодействието на 1,25ВД с ВДР е най-добре проучен по отношение на калциево-фосфорната обмяна. 1,25ВД стимулира синтеза на калбиндин 9К, както и на интестинални калциеви транспортери, увеличавайки калциевата абсорбция в тънки черва. Активирането на ВДР води до директно активиране на гени в остеобластите и активиране и диференциране на остеокластите, а също така и потискане синтеза на паратхормон (ПТХ) в паращитовидните жлези. С оглед на разпространението на ВДР в клетки от цялото тяло ВД има и допълнителни свойства като ренопротекция, потискане на РААС, имуномодулация, подобряване контрола на захарен диабет, противотуморна активност и др. В редица тъкани е налице небъбречна  $1\alpha$  хидрокси-лаза. Това е в основата на паракринните ефекти на 25ВД и 1,25ВД

Описаните по-горе данни правят оценката на ВД статуса от важно значение при пациентите с БТ. В настоящият труд се описва честотата на ВД недостатъчност при пациенти с БТ, посочват фактори влияещи на нивото на ВД в тази популация от болни, което се провежда за първи път в България. По този начин се изолират рискови групи бъбречнотрансплантирани. В допълнение се разглеждат плеiotропните ефекти на ВД, като се открива се възможност за подобряване на резултатите след БТ чрез адекватна ВД суплементация.

### **3. Литературен обзор**

#### **3.1. *Обща част***

##### **3.1.1. Синтез на витамин Д**

Витамин Д (ВД) и неговите метаболити представляват хормони и хормонни прекурсори, които се синтезират ендогенно – в кожата или се приемат от околната среда. Под

влияние на ултравиолетовите лъчи от слънцето 7- дехидроксихолестерол (известен още като провитамин Д) се трансформира в дермиса до превитамин Д, който под влияние на телесната температура изомеризира до витамин Д<sub>3</sub> (холекалциферол).

Освен синтез в кожата, витамин Д се набавя и с храненето, като хранителният прием отговаря за около 10% от общото количество ВД в организма (107). Екзогенният внос на витамин Д се осъществява основно чрез ергокалциферол (витамин Д<sub>2</sub>) и холекалциферол (витамин Д<sub>3</sub>). Източник на витамин Д<sub>2</sub> са предимно растителни продукти, докато на витамин Д<sub>3</sub> – животински продукти – млечни храни, рибно масло, яйчен жълтък и др. Метаболитите витамин Д<sub>2</sub> и Витамин Д<sub>3</sub> са с еквивалентна биологична активност и ефективност (104).

ВД е липофилна субстанция и след образуването в кожата или чревната резорбция попада в кръвообращението свързана с ВДСП, който пренася ВД до черният дроб, където под влияние на ензима 25 – хидроксилаза (СУР27А1) се трансформира до 25-хидроксивитамин Д (калцидиол, 25ВД). Полуживота на 25ВД е между 2 и 3 седмици, но значително намалява при загуба на ВДСП при нефрозен синдром.(31,231)

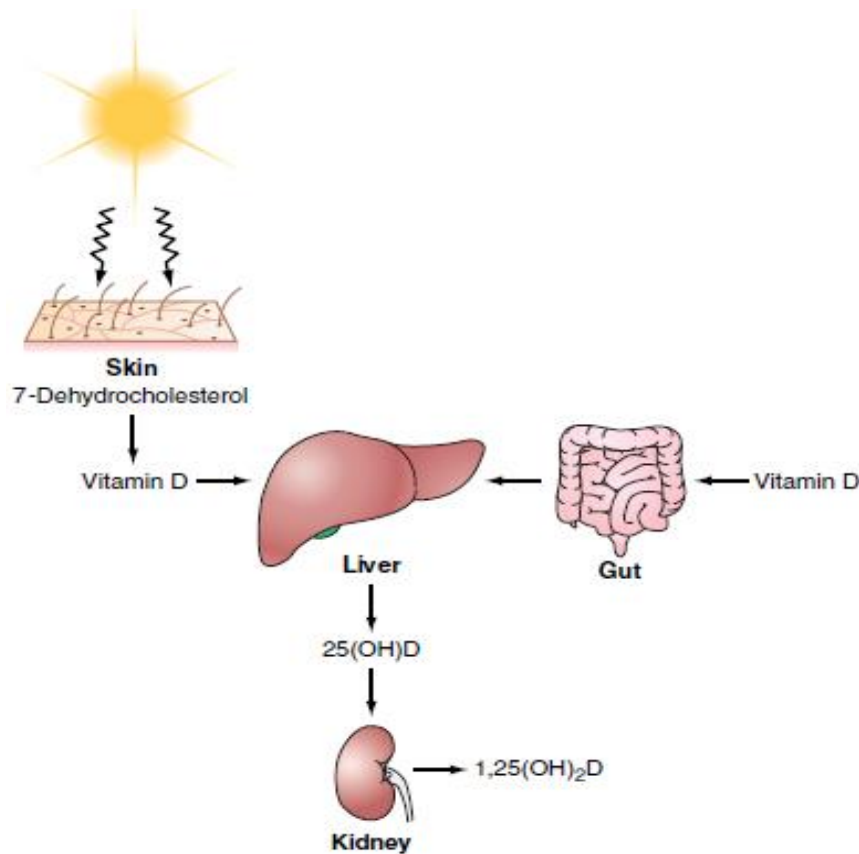
ВДСП е  $\alpha$  – глобулин с молекулно тегло 56кДа, синтезиран в черния дроб. Този белтък пренася всички метаболити на ВД, но най – висок афинитет има към 25ВД (5). Основна роля на ВДСП е да поддържа стабилни резерви на ВД в организма (169,245).

Следващата стъпка в активирането на витамин Д е хидроксилиране от ензима 1 $\alpha$  – хидроксилаза (СУР27В1) до 1,25 дихидроксивитамин Д (калцитриол), който представлява активният метаболит. Това става основно в тубулните клетки на бъбреците, но още и в клетки на плацентата, кератиноцити, грануломатозни клетки при саркоидоза, туберкулоза, берилиоза, при лимфоми. Небъбречна 1 $\alpha$  – хидроксилаза се открива още в кератиноцити, епителни клетки на дебело черво, лангерхансовите острови в панкреас, надбъбрек, парасимпатикусови ганглии, малък и краен мозък, епителни клетки в простатна и млечна жлеза, съдови ендотелни клетки (243). Инактивацията на калцитриол става с допълнително хидроксилиране чрез ензима 24-хидроксилаза (СУР24а1), който се локализира в редица тъкани. На фигура 1 са показани етапите в активацията на ВД.

Активността на бъбречната СУР27В1 се повлиява от редица фактори. ПТХ, ниско ниво на серумен калций и фосфор, пролактин, калцитонин, растежен хормон повишават активността на ензима, докато 1,25ВД, хормоните на щитовидната жлеза, мета-

болитната ацидоза и FGF23 потискат неговата активност (30, 15,132). Ензимът 24-хидроксилаза се активира от пептида FGF23, като по този начин се намалява нивото на активният 1,25ВД (209,113). Редица медикаменти също повлияват ВД статуса чрез активиране на 24-хидроксилазата, по механизма на активиране на нуклеотидния рецептор за Pregnane X. Такива медикаменти са някои антиепилептици, циклофосфамид, Рифампицин и др (92).

Фиг. 1. Образуване и активиране на витамин Д. Harrison's principles of Internal medicine, 16<sup>th</sup> edition, Bringham F et al



В таблицата по-долу са посочени метаболитите на ВД в организма (табл. 1).

Табл. 1. ВД и метаболитите му в организма.

	Витамин Д <sub>2</sub>	Витамин Д <sub>3</sub>	Сборно наименование
<b>Начална субстанция</b>			
Съкращение	Вит. Д <sub>2</sub>	Вит. Д <sub>3</sub>	Вит. Д
Пълно наименование	Витамин Д <sub>2</sub>	Витамин Д <sub>3</sub>	Витамин Д
Синоним	Ергокалциферол	Холекалциферол	
<b>След първо хидроксилиране</b>			
Съкращение	25ОН-вит.Д <sub>2</sub> Д <sub>2</sub>	25ОН-вит.Д <sub>3</sub> Д <sub>3</sub>	25ОН вит. Д
Пълно наименование	25-хидроксивитамин Д <sub>2</sub>	25-хидроксивитамин Д <sub>3</sub>	25-хидроксивитамин Д
Синоним	Еркалцидиол	Холекалцидиол	
<b>След второ хидроксилиране</b>			
Съкращение	1, 25(ОН) <sub>2</sub> -ВД <sub>2</sub>	1, 25(ОН) <sub>2</sub> -ВД <sub>3</sub>	1, 25(ОН) <sub>2</sub> -ВД
Пълно наименование	1,25- дихидроксивитамин Д <sub>2</sub>	1,25- дихидроксивитамин Д <sub>3</sub>	1,25- дихидроксивитамин Д
Синоним	еркалцитриол	Холекалцитриол	

#### Механизъм на действие

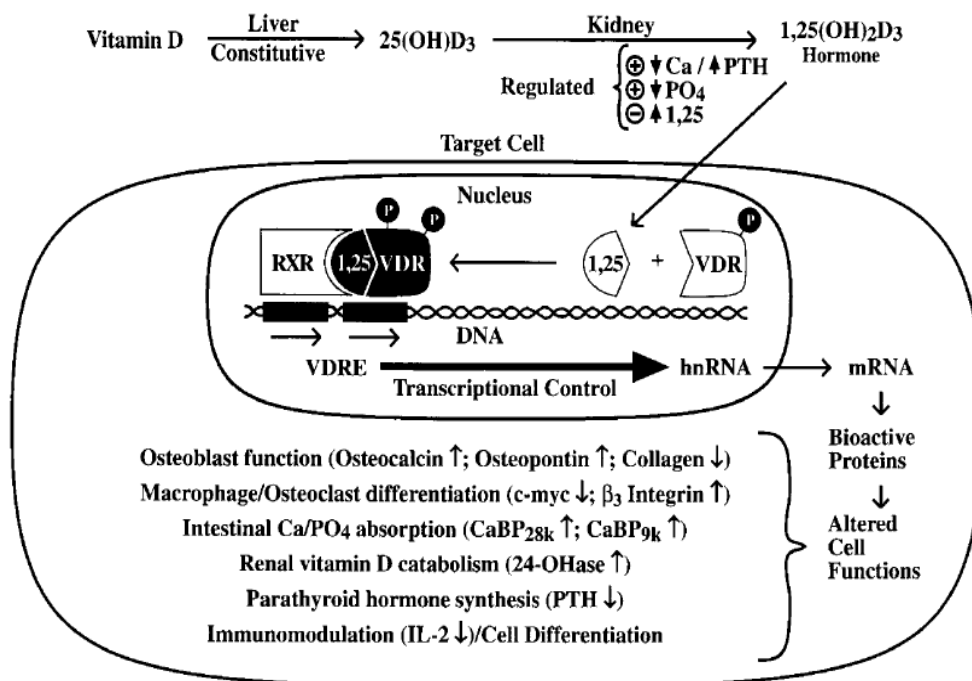
1,25ВД осъществява своите биологични ефекти чрез рецептора за ВД (ВДР). ВДР принадлежи на семейството на ядрени рецептори, към които се включват още рецепторът за ретиноева киселина, рецепторът за тиреоиден хормон, и др. (128). Комплексът ВД – ВДР образува хетеродимер с рецепторът за ретиноид Х (РХР), който се свързва с определени ДНК последователности (ВД реагиращи елементи, ВДРЕ), което води до експресия на таргентни гени (97). Активирането на ВДР може да доведе до потискане

на гени чрез потискане генна експресия или синтез на белтъци потискащи транскрипцията. Фигура 2 обобщава описания по-горе процес.

Афинитетът на ВДР към 1,25ВД е близо 1000 пъти по-голям от афинитета към другите метаболити на ВД. При нормални условия ВДР не се активира от другите метаболити, но при ВД токсичност високите нива на 25ВД водят до директно реагиране на 25ВД с рецептора и изместват 1,25ВД от ВДСП, което от своя страна води до повишена бионаличност на активният метаболит (31).

Възможен е и друг начин за активиране на ВДР. Комплексът 25ВД-ВДСП може да попадне в клетката чрез ендоцитоза по мегалин-подобен начин. Вътрнклетъчно протича хидролизиране на 25ВД до 1,25ВД (169).

Фиг. 2. Вътрнклетъчни ефекти на хетеродимера РХР-ВДР-1,25ВД.



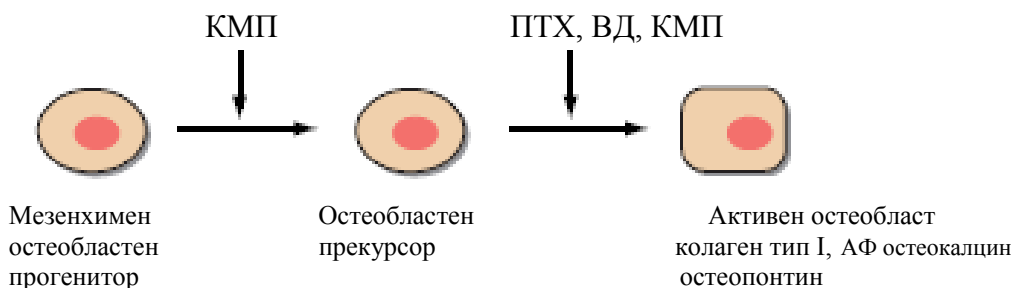
Третият възможен начин за активиране на ВДР е активирането на ВДР разположен в или близо до клетъчната мембрана, активирането на който води до активирането на редица негеномни процеси. Тези бързи ефекти са активиране на фосфолипаза A<sub>2</sub>, трансмембранен пренос на калциеви йони и др. (174,168).

ВДР е широко разпространен в тялото. При бозайници висока експресия е налице в бъбреци, черва, щитовидна жлеза, а умерена – във всички останали тъкани.

Взаимодействието на 1,25ВД с ВДР е най-добре проучен по отношение на калциево-фосфорната обмяна. ВД-ВДР взаимодействието води до промени в чревната абсорбция на калций, ремоделиране на костното вещество, потискане синтеза на ПТХ. 1,25ВД стимулира синтеза на калбиндин 9К (активен транспортер на калций в тънки черва), както и на интестиналните калциеви транспортери ЕСаС и ІСаС. По този начин се увеличава калциевата абсорбция в тънки черва. 1,25ВД увеличава и фосфатната абсорбция в тънки черва.

ВДР регулира гени в остеобластите и остеокластите. В остеобластите 1,25ВД активира синтеза на матриксни протеини, остеокалцин, остеопонтин (фиг. 3). 1,25ВД, заедно с ПТХ индуцира експресията на RANK лиганд, който осъществява диференциацията на остеокластите и увеличава тяхната активност (3).

Фигура 3. Активиране на остеобластите и роля на витамин д (ВД). КМП – костни морфогенни протеини, ПТХ – паратхормон, АФ – алкална фосфатаза



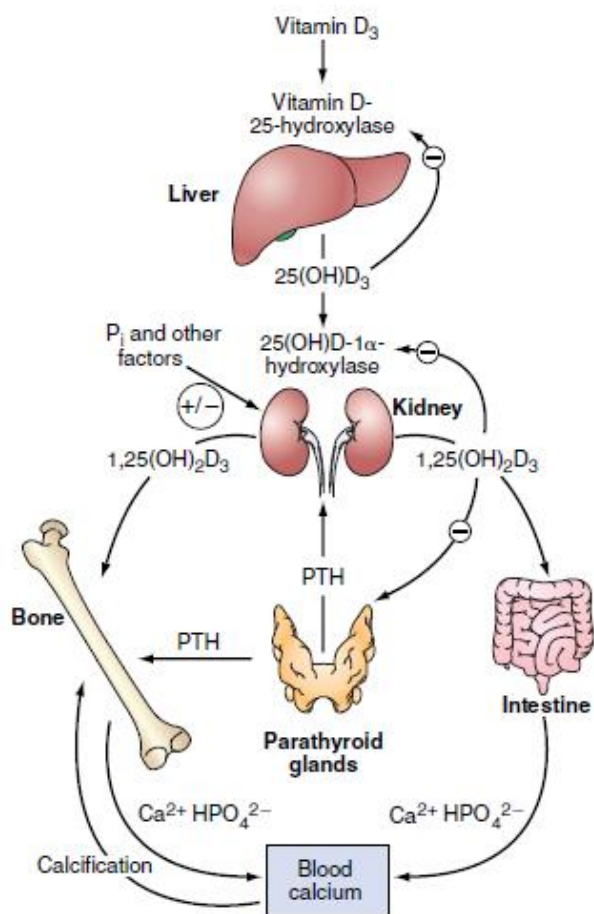
В паразитовидните жлези ВДР има антипролиферативен ефект върху клетките и потиска транскрипцията на ПТХ. Това свойство на рецептора се използва при лечението на вторичният хиперпаратиреоидизъм при пациенти с бъбречна недостатъчност.

1,25ВД увеличава абсорбцията на калций и фосфати в бъбречните тубули, като по този начин се намалява загубата им в урината. Това е сравнително слаб физиологичен ефект на ВД и е с малко значение за калциево-фосфорната обмяна (94). Ролята на ВД в калциево-фосфорната обмяна е обобщена във фиг. 4.

ВДР, СУР27В1 и СУР24А1 се разпространени в редица тъкани и клетки на организма. Освен това циркулиращите нива на 25ВД са около 1000 пъти по-високи от нивото на 1,25 ВД, с което може да се обясни автокринният и паракринен ефект на 25ВД върху определени клетки (117). В допълнение експресията на екстрареналната

СУР27В1 не се повлиява от факторите влияещи на калциево-фосфорната обмяна (65). Това е в основата на допълнителните свойства на ВД отвъд калциево-фосфорната обмяна като ренопротекция, антипролиферативен ефект, потискане на РААС, имуномодулация, подобряване контрола на захарен диабет (ЗД), противотуморна активност и др (197). Тези ефекти се означават още като неклассически или плейотропни ефекти (45,114) ще бъдат дискутирани по-късно.

Фиг. 4. Контрол на калциево-фосфорната обмяна.



### 3.1.2. Методи за определяне на ВД в серум / плазма

Прекурсорите на 25ВД – холекалциферол и ергокалциферол са липофилни субстанции, които трудно се определят количествено в серум-ма или плазмата. Те имат и сравнително кратък полуживот и се метаболизират в черен дроб до 25-хидрокси ВД<sub>3</sub> (калцидиол) и 25- хидрокси ВД<sub>2</sub> (еркалцидиол). Сборното им наименование е 25-хидрокси ВД (25ВД). Измерването на серумният 25ВД се счита за най-добрият начин за

оценка на ВД статуса поради дългият полуживот на метаболита – близо 3 седмици. Нивото на 25ВД е оценка за различните източници на ВД, включително хранителен внос и кожен синтез. Налице е изразена сезонност в нивото на калцидиол поради увеличената кожна продукция на холекалциферол в летните месеци. В момента се използват три основни подхода за количествено определяне на 25ВД в серума (123).

Златният стандарт за измерване на калцидиол е високоефективна течна хроматография (HPLC), но той не е широко разпространен в практиката поради факта, че е скъп, изисква специално подготвен персонал и отнема време. Предимството на метода е високата селективност и чувствителност, с възможност за разделяне на всички метаболити (3).

Имунохимичните методи за определяне на 25ВД<sub>2</sub> и 25ВД<sub>3</sub> са въведени през 1971 годи са в основата на натрупването на познания относно метаболизма на ВД. Поради редица недостатъци на първоначалния мет-од (114) той е използван основно в изследователски лаборатории. През 1985 год Hollis и Napoli създават радиоимунен метод за общ 25ВД, който е ко-специфичен за 25ВД<sub>2</sub> и 25ВД<sub>3</sub>. Получените стойности корелират добре с тези от HPLC анализа, поради което този тест става първият одобрен от Агенцията по Храните и Лекарствата на САЩ за широка клинична употреба. По-късно е въведен напълно автоматизиран хе-милуминисцентен тест, даващ възможност за бърз резултат. Методът е изтеглен от пазара през 2006 год. През 2004 год компанията DiaSorin (Stillwater, MN, USA) въвежда своя напълно автоматизиран хемилуминисцентен метод, който е ко-специфичен за 25ВД<sub>2</sub> и 25 ВД<sub>3</sub>, като се получава резултат за общия 25ВД. Същата фирма през 2007 год създава второ поколение на същият метод, с подобрена точност и възпроизводимост (67). Други производители също създават автоматизирани радиоимунни и ензимни имуноабсорбентни тестове, но за тях няма достатъчно публикувани данни за аналитичните им характеристики и не са с широка употреба. Основните предимства на имунохимичните методи са бързина, удобства за високосериен анализ, реализация с масово разпространени стандартни лабораторни анализатори. Недостатък са високата цена и недостатъчната надеждност на резултатите с оглед на около тридесетте метаболита на ВД в серума(114).

Третият метод за анализ е течна хроматография и мас-спектомет-рична детекция (LC-MS/MS). Също както HPLC методът може да определи количествено 25ВД<sub>2</sub> и

25ВД<sub>3</sub>, което го отличава от имунохимичните техники. Методът е много точен и корелира добре с резултатите от радиоимунното изследване на DiaSorin (200,228). LC-MS/MS методът е втория по честота на приложение в практиката след радиоимунния за оценка циркулиращите нива на 25ВД. Широкото му приложение се ограничава от високата цена и нуждата от добре подготвен персонал. Само HPLC и LC-MS/MS методите могат да определят нивото на 25ВД<sub>2</sub> и 25 ВД<sub>3</sub>, При радиоимунните методи се получава резултат за общият 25ВД в серума. Спорно е до колко способността за определяне на отделните видове 25ВД е от голямо значение, тъй като и двата метаболита имат сходен биологичен ефект (104, 111).

Работната група на KDIGO препоръчва на клиницистите да са информирани за типа метод при оценка на ВД статуса. На този етап различните аналитични методи не са добре стандартизирани и дефиницията на ВД дефицит не е добре валидирана. Препоръчва се използването на една и съща лаборатория при проследяването на нивата. Най – подходящи са методите, които измерват 25ВД<sub>2</sub> и 25ВД<sub>3</sub> (123).

С цел доказване на надеждността на метода за изследване на 25ВД и 1,25ВД, както и за получаване на методическа помощ, през 1989 год е създадена програма за външна оценка на надеждността на анализите на 25ВД и 1,25ВД (DEQAS, Vitamin D Quality Assessment Scheme, [www.deqas.com](http://www.deqas.com)).

Рутинното изследване на 1,25ВД не се препоръчва тъй като липсва стандартизиране на различните аналитични методи, полуживотът на метаболита е кратък и нивото му се повлиява от екзогенният внос на кал-цитриол и аналози на ВД. В допълнение няма данни подкрепящи факта, че измерването на 1,25ВД може да се използва в коригиране на терапията или в оценка за бъдещи клинични резултати (123).

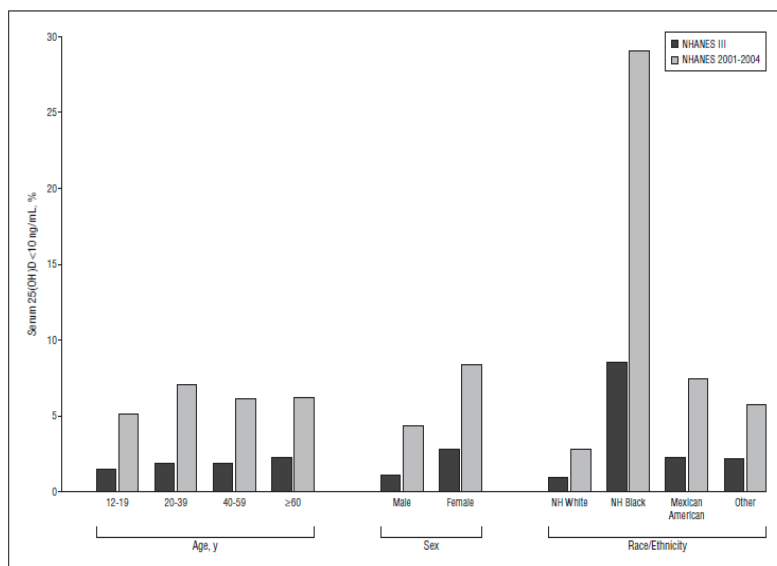
### **3.2. Патологични отклонения в статуса на ВД**

Няма консенсус по отношение на нивата на 25ВД, определящи термина ВД дефицит. Серумно ниво под 25 pmol/L се означава от повечето автори като ВД дефицит, водещ до развитие на рахит и остеомаляция (3). Някои автори обаче посочват и ниво под 50 pmol/L като гранична стойност за ВД дефицит (20).

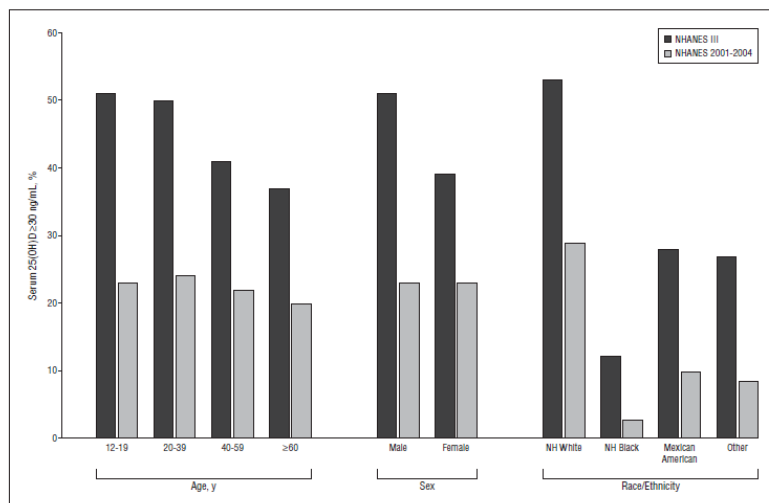
Нивото на 25ВД е свързано обратно пропорционално с нивото на ПТХ. Когато 25ВД достигне нива от 75 – 100nmol/L нивото на ПТХ спи-ра да се понижава (37). В допълнение, калциевата чревна абсорбция се увеличава с около 45-65% при покачване на нивото на ВД от 50 на 80 nmol/L(99). С оглед на посочените данни ниво на ВД над 75-80 nmol/l се считат за ВД насищане (45, 37). Плазмени нива в диапазона 25 – 80 nmol/L се означават като ВД недостатъчност, като ниво между 50 и 75 nmol/L се счита за относителен недостиг на ВД (109). За токсично ниво на 25ВД се считат стойности над 374nmol/L (55).

Използвайки тези определения, около 1 милиард човека по света са с дефицит или недостатъчност на ВД (104,37). Особено висока е честотата при постменопаузални жени – до 50%, сред испаноговорящи и афро-американци в САЩ, деца и подрастващи (141, 86, 215). Висока честота на субоптимални ВД нива след деца (30-50%) се забелязва и в топлите страни, където кожата се протектира от слънчевото греене (205, 158, 161). Налице е и тенденция към задълбочаване на проблема. В САЩ броят на хората с ВД дефицит се е увеличил от 2% на 6% за поледните 10 години, докато броят на тези с ниво над 75 nmol/L е намалял почти двойно от 45 на 23% (81), (фиг. 5 и 6)

Фиг. 5. Честота на стойности на серумно ниво на 25ВД под 10ng/mL (25 nmol/L)в Трето Национално Проучване на Здравето и Храненето (NHANES III 1988 - 1994) и NHANES 2001-2004.



Фиг.6. Честота на стойности на 25ВД над 30ng/mL (75 nmol/L) при NHANES III и NHANES 2001-2004



Ниски нива на 25ВД се откриват и при здрави деца и възрастни, което прави ВД недостатъчността широко разпространен и недооценен проблем в световен мащаб (66,223).

Проучванията в България са със сходен резултат. При проучване на Борова и сътр. 75.8% от изследваните болни са със серумно ниво на 25ВД под 50nmol/L, като ВД дефицит се установява значително по-често при лица от женски пол (2).

Фактори, влияещи на нивото на 25ВД

Метаболизмът на 25ВД и 1,25ВД се повлиява от различни фактори на различни нива. Те са обобщени в таблицата по-долу (вж. табл.2).

Табл. 2. Фактори повлияващи концентрациите на 25ВД и 1,25ВД и механизмите на въздействие. AD – автозомно-доминантно, SPF – слънцезащитен фактор, ХБЗ . хронично бъбречно заболяване

Причина	Механизъм за ВД недостатъчност
Намален синтез в кожата	
Раса и генетични фактори	Кожната пигментация може да намали синтеза до 99%

Възраст	ВД синтез спада до 75% при 70 год. Възраст
Кожни присадки след изгаряне	Намален кожен синтез
Сезонност, географска ширина, време от денощието	При геогр. ширини над 37 <sup>0</sup> , синтеза спада до 0 от ноември до февруари
Слънцезащитни кремове	SPF 15 намалява синтеза с 99%
<b>Неадекватен хранителен внос</b>	
Адекватният внос зависи от възрастта на човека и придружаващи състояния и заболявания	
Кърмене	Ниско съдържание на ВД в майчиното мляко. Рисков фактор за ВД дефицит при хранене само от кърмене
<b>Намалена бионаличност</b>	
Малабсорбционен синдром – при Кистична фиброза, болест на Whipple, Болест на Крон и др	Намалена резорбция на липиди, вкл. и ВД
Затлъстяване – секвестрация на ВД в мастната тъкан	Намалена бионаличност на ВД
<b>Увеличен катаболизъм</b>	
Антиконвулсанти	Свързване с рецепторите за стероиди/прегнан X/ксенобиотичен рецептор, водещо до активиране на CYP24A1 и увеличен катаболизъм на 25ВД и 1,25ВД
Ретровирусни препарати	
Кортикостероиди	
Рифампицин	

Намален синтез на 25ВД	
Леко до умерено чернодробно увреждане	Малабсорбция на ВД, все още е налице 25ВД синтез
Напреднала чернодробна болест	Намален синтез на 25ВД
Повишена загуба в урината	
Нефрозен синдром	Загуба на комплекса 25ВД – ВДСП, водещ до големи загуби на ВД в урината.
Намален синтез на 1,25ВД	
Ранни етапи на ХБЗ (II – IIIст)	Хиперфосфатемия, ↑ FGF23 – потискане активността на CYP27B1
Късни етапи ХБЗ над 3ст	Недостатъчен синтез на 1,25ВД поради липса на субстрат.
Намаляване на 25ВД при ХБЗ	
Намален внос на белтъци	Недостатъчен внос на ВД
Повишено ниво на FGF23	Активиране на CYP24A1, повишен катаболизъм на 25ВД
Протеинурия	Загуба на ВД в урината
Възраст	Намален синтез в кожата
Африканска раса	Намален синтез, ХБЗ – по-честа в тази раса
Намалено слънчево излагане	Поради възраст, намалена активност, коморбидност.
Наследствени заболявания – рахит	
ВД зависим рахит тип I	Мутация на бъбречната CYP27B1, с намален до липсващ 1,25ВД

ВД зависим рахит тип 2	Мутация на ВДР, резистентност към 1,25ВД и завишени негови нива
ВД зависим рахит тип 3	Свръхпродукция на белтъци, свързващи се с ВДРЕ – блокиране транскрипцията на ВДР-зависимите гени
AD – свързан хипофосфатемичен рахит	Мутация в гена за FGF23, потисната активност на CYP27B1
X-свързан хипофосфатемичен рахит	Мутация на гена PHEX, повишени нива на FGF23, потисната активност на CYP27B1
<b>Придобити заболявания</b>	
Тумор-индуцирана остео-малация	Туморна секреция на FGF23
Първичен хиперпаратиреоидизъм	Увеличено ниво на ПТХ, водещо до увеличена конверсия на 25ВД до 1,25ВД Понижени нива на 25ВД, завишени на 1,25ВД
Грануломатозни заболявания – саркоидоза; Туберкулоза, лимфоми	Конверсия на 25ВД до 1,25ВД в макрофагите. Понижени нива на 25ВД, завишени на 1,25ВД
Хипертиреоидизъм	Увеличена конверсия на 25ВД до 1,25ВД

### 3.2.1. Намален кожен синтез

#### А. Роля на расовите особености

Тъмно пигментираната кожа поглъща UVB лъчите. По тази причина хора с кожен тип 5 – 6 (тъмнокожи) се нуждаят от 10 до 50 пъти по-голяма експозиция на слънце в сравнение с тези тип 2 – 3 (светлокожи) (46). В третото проучване NHANES проведено в периода 1988 – 1994 год се установява близо 10 пъти по-висока честота на ВД недостатъчност при афроамериканки в репродуктивна възраст, в сравнение с американки от бялата раса (223). Тези факти доказват, че хората с повишено меланиново съдържание рискови за ВД недостатъчност, като при тях се препоръчва профилактично измерване на 25ВД (при деца), както и съобразяване на диетичният режим (173, 224).

#### Б. Роля на слънцезащитни средства

Използването на слънцезащитни средства е един от основните фактори за намаленият синтез на ВД в кожата. Използването им е с особена важност при пациенти с органна трансплантация с оглед профилактиката на кожни неоплазии. Доказано е, че средства със SPF (слънцезащитен фактор) 8 намаляват продукцията на ВД в кожата с 95%, а със SPF 15 намалението е с 99% (109).

#### В. Географска ширина, сезонност, стил на живот

Кожният синтез на ВД зависи от броя на фотони в спектъра на UVB лъчите, достигащи повърхността на земята в зенита на слънцето. При географски ширини над 37° Север и под 37° Юг слънчевата светлина е недостатъчна да индуцира синтез на ВД в кожата през зимните месеци. Важно е да се отбележи, че фактори като замърсеност на въздуха в градовете също оказва влияние върху нивото на ВД, чрез намаляване на UVB лъчението, достигащо до земята (173, 1). Географската ширина обаче не е единственият фактор, който влияе на кожният синтез. Високата честота на остеомалация при жени, рахит при деца и ВД недостатъчност в двете групи в Саудитска Арабия се определя от културните особености на страната с покриване на цялото тяло и избягване на директна слънчева светлина (215, 218). Заседналият начин на живот и намалената физическа активност на открито също са значими фактори, повлияващи образуването на ВД в кожата (218). При други етноси е налице по-голяма консумация на храни богати на ВД. Пример за това е по-високото 25ВД ниво при имигранти от Шри Ланка в Норвегия в сравнение с имигранти от Пакистан (112).

### Г. Възраст

Редица фактори влияят на концентрациите на ВД при възрастните пациенти. Основни причини са хранителен дефицит и намален синтез в кожата. При 70 годишен човек синтезът на ВД<sub>3</sub> е намален близо 4 пъти в сравнение с човек на 20 години (150,105). С напредването на възрастта нивата на ВД се понижават независимо от сезона (198). Чревната абсорбция не се променя значимо с възрастта, с изключение при прием на холестирамин (144). Допълнителни фактори водещи до намалена продукция на ВД е намалената физическа активност и излизане на открито при тази група болни.

### Д. Пол

Понижени концентрации на ВД се откриват при мъже и жени във всички възрастови групи. Проучванията показват по-ниски нива на ВД при жените в Европа (212, 229). Същите резултати се откриват при американци от различни етнически групи, здрави мъже и жени в Нова Зеландия (146, 26). Разликата се потвърждава в популации живеещи в селата и градове (95). При преизчисляване според процента на телесна мастна тъкан разликите стават незначими, което подсказва, че по-ниските нива на 25ВД при жени се обясняват с отлагане на ВД в мастните депа (229). В допълнение, бременни жени и такива с продължително кърмене са с повишен риск за ВД (36, 230). Стилът на обличане при някои етноси и носене на було от жените през цялата година също влияе за по-ниски ВД концентрации спрямо мъжете от същата група (165). Проучване на Gaugris и сътр. доказва по-висока честота на субоптимални концентрации на 25ВД при постменопаузални жени и такива с остеопороза, като 52% от жените лекувани за остеопороза са били с нива под 75 nmol/L (80, 106).

## 3.2.2. Намалена бионаличност

### А. Чревна малабсорбция

Много фактори са свързани с абсорбцията на ВД – стомашна, панкреатична и жлъчна секреция, формиране на мицели, дифузия, транс-порт през чревната клетка (225, 103). Тъй като ВД е неполярна стеролна молекула, той трябва да се разтвори чрез инкорпориране в мицели от жлъчни киселини, за да се абсорбира във водна среда (153). Този процес се нарушава значително при нарушаване на панкреатичната и жлъчната секреция. Липидоразтворимите витамини са чувствителни на нарушения на липидната

абсорбция, поради което ВД малабсорбция може да се развие и без клинично проявена стеаторея. Етиологията на малабсорб-ционният синдром е обобщена в табл. 3.

Табл.3. Етиология на малабсорбционният синдром. ЖК - жлъчни киселини, <sup>a</sup> - множествен механизъм на действие.

Неадекватно смилане
След гастректомия
Дефицит/инактивация на панкреатична липаза - екзокринна панкреатична недостатъчност (хрон. панкреатит, карцином на панкреаса, кистична фиброза и др), Gastrinoma <sup>a</sup> , медикаменти – Орлистат
Намалена интрадуодуална концентрация на ЖК/нарушен синтез на мицели
Чернодробна болест - паренхимно чернодробно заболяване, холестаза
Свърхрастеж в тънко черво - анатомична (сляпа вримка, стриктури, фистули) и функционална стаза (диабет <sup>a</sup> , склеродермия <sup>a</sup> , чревна псевдообструкция)
Нарушен ентерохепатален кръговрат на ЖК - илеална резекция, Болест на Крон <sup>a</sup>
Медикаменти - свързват се с ЖК - неомицин, холестирамин, калциев карбонат
Нарушена лигавична абсорбция/лигавична загуба или дефект
Интестинална резекция или бай-пас
Възпаление, инфилтрационни процеси, инфекции - болест на Крон <sup>a</sup> , амилоидоза, склеродермия <sup>a</sup> , лимфом, еозинофилен ентерит, тропическо шпру, цьолиакия, болест на Whipple <sup>a</sup> , дефицит на фолиева киселина и вит. В12, Giardiasis
Генетични заболявания - дизахаридазен дефицит, агамаглобулинемия, абеталипопротеинемия, цистинурия, болест на Hartnup.
Нарушен транспорт на хранителни вещества към и от червата
Лимфатична обструкция - лимфом <sup>a</sup> , лимфангиектазия

Сърдечносъдови нарушения - затойна сърдечна недостатъчност, констриктивен перикардит, атеросклероза на мезентриална артерия, васкулит.
Ендокринни и метаболитни заболявания
Захарен диабет <sup>a</sup>
Хипопаратиреоидизъм
Надбъбречна недостатъчност
Хипертиреозидизъм
Карциноиден синдром

Поради увеличеният риск от 25ВД недостатъчност при пациентите с описаните по-горе заболявания е удачно проконтролирането на серумната 25ВД концентрация.

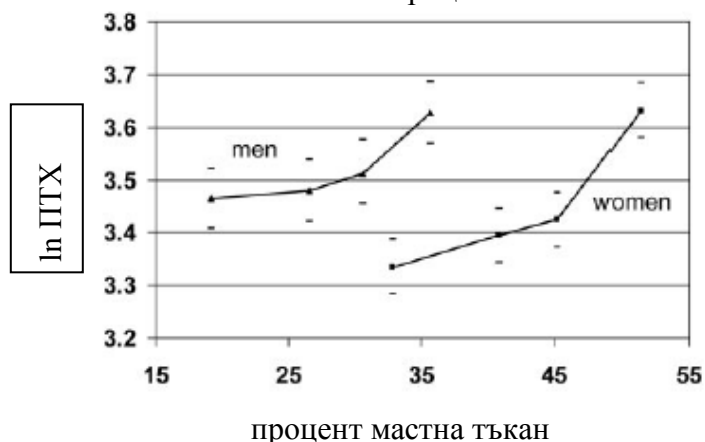
#### Б. Затлъстяване

Редица проучвания дамонстрират, че индексът на телесна маса (ИТМ) и съдържанието на мазнини в тялото са обратнопропорционално свързани с нивото на 25ВД и правопрпорционално свързани с нивото на ПТХ (212), фиг. 7 и 8. Лечението с UVB лъчи и ВД пер ос е свързано с по-ниско покачване на нивото на 25ВД при пациенти с по-висок ИТМ (241).

Фиг. 7. Отношение на процента телесна мастна тъкан и ниво на 25ВД (ng/mL; 1ng/mL=2.5nmol/L)



Фиг. 8. Отношение на процента телесна мастна тъкан и ниво на ПТХ (lnПТХ)



Обяснение за по-ниското ниво на 25ВД при затлъстяване е секвестриране на ВД в подкожната мастна тъкан и намалено освобождаване в циркулацията. Поради високата честота на затлъстяване и повишеният риск от субоптимални концентрации на ВД, при тези болни трябва проф-илактично да се изследва серумното ниво на 25ВД (ИТМ > 30кг/м<sup>2</sup>)(3)

### 3.2.3. Неадекватен хранителен внос

Хранителният внос осигурява около 10% от общото ниво на 25ВД в организма, но въпреки това е от голямо значение – доказано е, че във Франция, където добавката на ВД е най-слаба, зимните стойности на 25ВД при възрастни спадат до 20-25nmol/L при 40% хората(178). Препоръчителните дози витамин Д зависят от възрастта на човека, както и от състояния като бременност, кърмене, както и деца хранещи се само с кърмене (224). Препоръчителните приеми и максималните нива на безопасен прием са посочени в таблица 4.

Табл. 4. Дневен препоръчителен прием на ВД според възрастова група.

Възрастови групи	Препоръчителен хранителен прием		Максимално ниво на безопасен прием	
	IU/дневно	µg/дневно	IU/дневно	µg/дневно
Деца 0 – 6 мес	400	10	1000	25
Деца 6-12 мес	400	10	1500	37.5
Деца 1-3 год	600	15	2500	62.5

Деца 4-8 год	600	15	3000	75
Деца 9-18 год	600	15	4000	100
19 – 70 год	600	15	4000	100
Над 70 год	800	20	4000	100
Бременни/кърмачки	600	15	4000	100

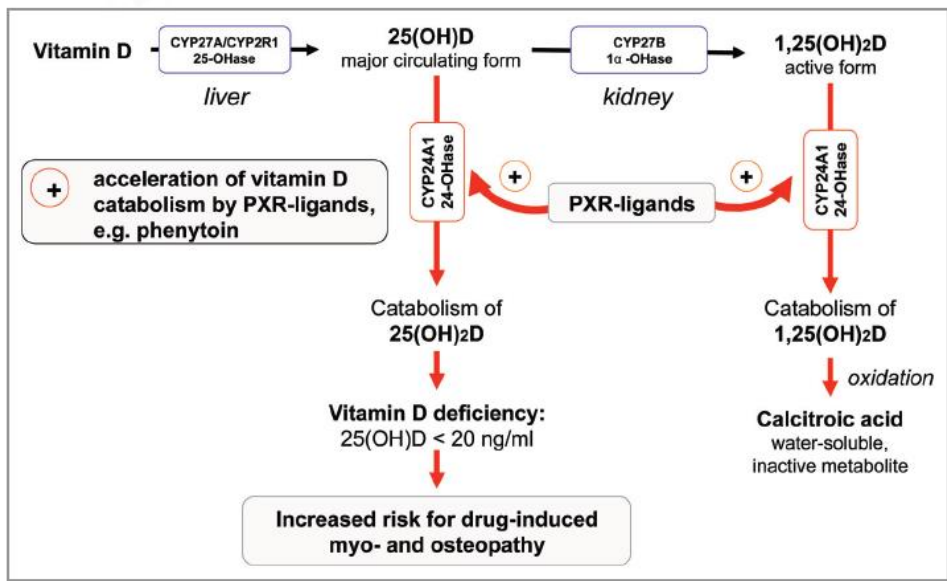
### 3.2.4. Увеличен катаболизъм на 25ВД

Различни медикаменти могат да повлияят на катаболизма на ВД чрез активирането на рецептора за Прегнан Х (РПХ). Той принадлежи на семейството на ядрените рецептори и играе роля в детоксикацията от медикаменти и ксенобиотици (92). Открива се в клетките на гастроинтестиналния тракт, бъбреците, черен дроб и показва до 60% сходна структура с ВДР. Ето защо РПХ може да се свърже с ВДРЕ и да блокира експресията на ВДР-зависими гени.

Молекулите свързващи се с РПХ са структурно различни. Към тях се включват различни видове медикаменти : антиконвулсанти (фени-тоин, карбамазепин), противовъзпалителни средства (Дексаметазон), антинеопластични медикаменти (Циклофосфамид, Тамоксифен), антибиотици (Рифампицин, Клотримазол), антихипертензива (Нифедипин, Спиринолактон), антиретровирусни препарати, билкови средства като жълт кантарион и др.

Описаните медикаменти служат като лиганди, активиращи РПХ. Активирането на РПХ води до увеличена експресия на СYP24A1, което води до увеличен катаболизъм на 25ВД и 1,25ВД до неактивни продукти (фиг.9).

Фигура 9. Ускоряване катаболизма на 25ВД и 1,25ВД след активиране на РПХ



Пациентите лекувани с описаните групи медикаменти са с повишен риск от ВД недостатъчност, поради което при тях трябва да се проконтролира нивото на 25ВД. Тези болни се нуждаят от ВД суплементация, в дози 2 – 3 пъти по-високи от описаните по – горе за съответната възраст (224).

### 3.2.5. Намален синтез на 25ВД

#### А. Чернодробно увреждане

В ранните етапи на чернодробното увреждане, черният дроб е със запазена способност да синтезира 25ВД. Намалването на синтеза се дължи на малабсорбция на ВД във връзка с намаленото образуване на жлъчни киселини, а оттам и на мицели в червата – табл. 3 (79). В по-напредналите стадии на чернодробното заболяване е налице невъзможност за синтез на 25ВД.

#### Б. Лечение с изониазид

Лечението с изониазид води до потискане активността на 25-хидроксилазата и намаляване нивото на 25ВД (31, 206).

### 3.2.6. ВД метаболизъм при ХБЗ и нефрозен синдром

#### А. Промени при нефрозен синдром.

В нормално състояние 25ВД е свързан до 88% с ВДСП, 0.03% циркулира като свободна форма, а останалата част е свързана с албумин (31). При нефрозен синдром е налице голяма загуба на комплекса 25ВД – ВДСП в урината. Нарушава се мегалин и кубулин - зависимата ендоцит-оза на 25ВД в епителните клетки на проксималните тубули, което води до намален полуживот на 25ВД и нарушение в синтеза и на 1,25ВД (44).

#### Б. Промени при хронично бъбречно заболяване (ХБЗ)

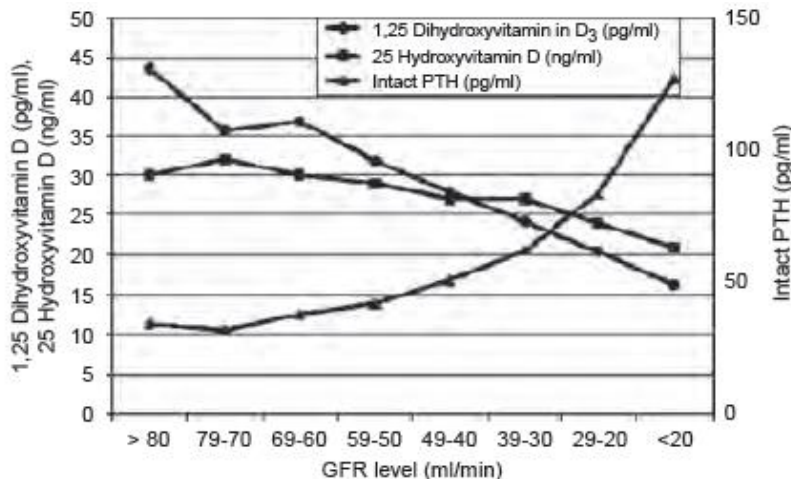
Промените в метаболизма на 25ВД и 1,25ВД започват още в ранните стадии на ХБЗ – преди стадий 3 (56).

Централна роля в промените на ВД метаболизма се пада на намаляването на серумната концентрация на 1,25ВД. Това става още при ХБЗ I ст – при проучване на Levin и сътр. 13% от болните с иГФ под 80мл/мин/1,73м<sup>2</sup> е установено ниво на 1,25ВД под 22pg/mL (136). В началните стадии причината е понижена активност на 1- $\alpha$  хидроксилазата поради завишените плазмени нива на неорганичен фосфор, FGF23, хиперурикемия, метаболитна ацидоза, също така и на намаленото количество на субстрата ензима (25ВД) (109, 136, 232, 122), графика 1. В по-напредналите стадии концентрацията на 1,25ВД намалява поради липсата на достатъчно функциониращи нефрони (109).

Намаляването на 25ВД се дължи на следните фактори – по-висока честота на възрастни пациенти при болните с ХБЗ, диетичният режим при ХБЗ, с ограничаване приема на храни богати на ВД – риба и мляко, намален кожен синтез на ВД при уремични болни, загуба на 25ВД при протеинурия, по-висока честота на африканци сред пациентите с ХБЗ, по-висока честота на затлъстяване и намалена двигателна активност при ХБЗ (56, 115). Част от тези фактори са специфични за ХБЗ, докато другите фактори са налице и в други заболявания. Данните за честотата на субоптималните нива на 25ВД показват, че тя е често срещана при болните с ХБЗ – ниво под 75nmol/L се отчитат до 86% от болните с ХБЗ III-IV ст, а с ХБЗ 5Д честотата достига до 92% (43, 238).

В допълнение, при ХБЗ експресията на ВДР е значимо намалена (242)

Графика 1. Серумно ниво на 1,25ВД, 25ВД, ПТХ при различни нива на бъбречна функция – Levin et al (74). 1 ng/mL = 2.5 nmol/L



### 3.2.7. Наследствени дефекти в метаболизма на ВД

При деца, преди сливането на епифизите на костите да стане факт, дефицитът на ВД води до забавяне на растежа и разрастване на растежният слой. Това състояние се нарича рахит. В нормалният растежен слой на костите има 3 зони от хондроцити – резервна зона, пролифе-рираща зона, хипертрофична зона. При рахит е налице експанзия на хипертрофичната зона, което се дължи в нарушена апоптоза на хондроцитите от тази област. процес, предшестващ заместването им от остеобласти. Хипофосфатемията е основен фактор за развитието на рахитична растежен слой, тъй като фосфатите активират апоптозата на хондроцитите. В подкрепа на това твърдение е факта, че рахитни промени се установяват освен при ВД дефицит и при редица синдроми, свързани с фосфат-на загуба (31). По-долу са изброени по – честите причини за рахит, с изключение на недостатъчен прием пер ос.

#### А. Витамин Д зависим рахит тип 1

Налице е мутация на гена за CYP27B1, поради което е налице силно намаляване синтеза на 1,25ВД. Налице е хипокалциемия и хипофосфатемия (127).

#### Б. Витамин Д зависим рахит тип 2

Налице е мутация на гена за ВДР. В резултат се получава частична или пълна резистентност към действието на 1,25ВД, придружено от повишено ниво на 1,25ВД.

#### В. Витамин Д – зависим рахит тип 3

При този тип рахит е увеличен синтеза на белтъци, свързващи се с ВДРЕ. В резултат на това е намалена транскрипцията на ВДР – зависимите гени и резистентност на таргентните клетки към действието на 1,25 ВД. При този тип също е налице завишена концентрация на 1,25ВД (38).

#### Г. Автозомно-доминантен хипофосфатемичен рахит

Тук е налице мутация в гена за FGF23, при който разграждането на този растежен фактор е намалено. Това води до фосфатурия, намалена чревна резорбция на фосфати, хипофосфатемия, намалена активност на CYP27B1 и намален синтез на 1,25ВД.

#### Д. X - свързан хипофосфатемичен рахит

Касае се за мутация на гена PHEX. Това води до завишени нива на FGF23. И тук както при по-горната форма на рахит се стига до фосфатурия, намалена чревна резорбция на фосфати, хипофосфатемия, намалена активност на CYP27B1 и намален синтез на 1,25ВД (208).

### **3.2.8. Нарушения във ВД метаболизма при други придобити заболявания**

#### А. Тумор – индуцирана остеомаляция

Туморна секреция на FGF23, водеща до хипофосфатемия и потиснат синтез на 1,25ВД

#### Б. Грануломатозни заболявания

При заболявания като берилиоза, саркоидоза, други грануломатозни заболявания, туберкулоза, някои лимфоми е налице конверсия на 25ВД до 1,25ВД в макрофагите. Нивото на 25ВД е намалено, докато това на 1,25ВД – увеличено, налице е хиперкалциемия. (8, 102).

#### В. Първичен хиперпаратиреоидизъм

Свръхпродукцията на ПТХ води до стимулиране на CYP27B1, водещо до увеличено ниво на 1,25ВД и намалено на 25ВД, отново с прояви на хиперкалциемия.

#### Г. Хипертиреоидизъм

При хипертиреоидизъм е налице повишен катаболизъм на 25ВД и 1,25ВД поради активирание на CYP24A1.

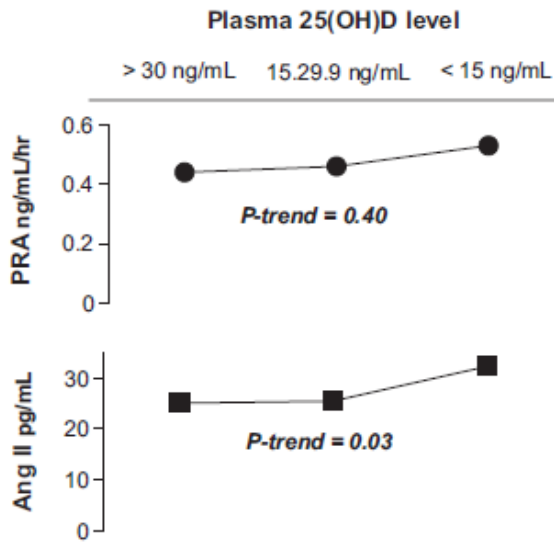
### **3.3. Значение на ВД – класически и плейотропни ефекти**

Класическият ефект на ВД – влиянието му върху калциево-фосфорната обмяна е най-добре проученият аспект от неговото действие. Той беше вече споменат в настоящото изложение. По-долу ще бъдат описани постоянно нарастващата информация за плейотропните свойства на витамина. Тези свойства се базират на широкото разпространение на ВДР в тъканите, както и наличието на екстраренална 1- $\alpha$  хидроксилаза, не повлияваща се от нивата на серумен калций, фосфор, ПТХ (за разлика от реналната форма на ензима) (65). Към плейотропните ефекти се включват потискане на ренин-ангиотензин – алдостероновата система (РААС), ефекти от страна на сърдечносъдовата система (ССС), ренопротекция, имуномодулация, повлияване контрола на ЗД и др.

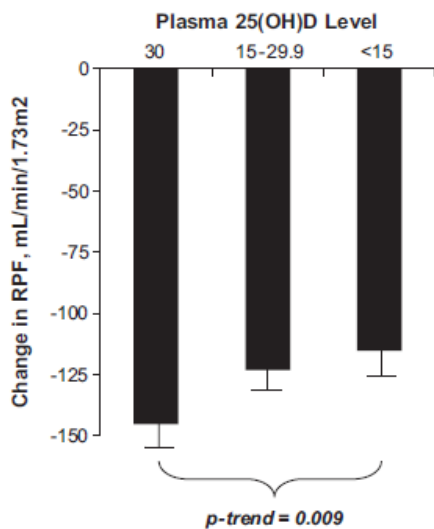
#### **3.3.1. Повлияване на РААС**

Редица проучвания върху опитни животни доказват негативната връзка между нивото на 25ВД и активността на РААС (139, 140, 249). Forman и сътр. докладват за негативна връзка между нивото на 25ВД и концентрацията в плазмата на ангиотензин II при нормотензивни доброволци, без значима връзка в плазмената ренинова активност. Налице е и редуцирано понижаване на бъбречния кръвоток при инфузия на ангиотензин II при участниците с ниво на 25ВД под 35 pmol/L. Тези факти потвърждават тезата за активизирането на РААС при 25ВД дефицит (73), графики 2 и 3. Редица изследвания при животни потвърждават описаните по-горе данни, като се доказват завишени нива на ренин и ангиотензин II при мишки негативни за ВДР. Възможно е цитираните резултати да се обясняват с потискане от 25ВД на ренин-независимият синтез на ангиотензин II чрез потискане на транскрипцията на нуклеотидният фактор  $\kappa\beta$  (59, 137), блокирайки по този начин превръщането на ангиотензиноген до ангиотензин II чрез катепсини (88, 121).

Графика 2. Увеличено плазмено ниво на ангиотензин II според плазмената концентрация на 25ВД по време на диета богата на натрий



Графика 3. Намален отговор при инфузия на ангиотензин II при пациенти с ниско 25ВД ниво. Концентрацията е в ng/ml; 1ng/ml= 2.5nmol/l



Други експериментални изследвания също показват индиректно положителния ефект от

активирането на ВДР, комбиниран с АСЕ – инхибитор или ARB (247, 167). Отново се касае за животински модели, като изследванията върху хора са сравнително малко.

### **3.3.2. Сърдечносъдова система и ВД**

Редица проучвания доказват връзката между дефицита на 25ВД и честотата на остър миокарден инфаркт, мозъчен инсулт, артериална хипертония, периферни съдови заболявания и обща смъртност (64, 235, 83, 188, 162). Възможни са няколко механизма за положителен ефект на ВД върху ССС. На първо място е споменатото потискане на РААС. На второ място има данни за подобряване на инсулиновата чувствителност от 25ВД, което може да обясни и положителният ефект върху ССС патологията (118). Третият механизъм е директно повлияване на тъканите и клетките на ССС от 25Д. Дефицитът на ВД е свързан с нарушена релаксация и контрактилитет на мускулатурата на сърцето, както и с камерна хипертрофия. Вероятно находката е свързана с потискане на хипертрофията на кардиомиоцитите от ВД (192, 227, 210, 17). ВД активира синтеза на атриален натрийуретичен пептид, което също оказва влияние върху честотата на ССС заболяемост (40). ВД повлиява физиологията на периферните съдове. ВД дефицит се асоциира с ендотелна дисфункция, намалена съдова разтегливост, увеличена концентрация на инфламаторни цитокини, атерогенна активност и повишена пролиферация на гладкомускулни клетки в стената на съдовете (145, 18, 214, 202). Описаните промени са част от обяснението за повишената смъртност и честота на ССС заболявания при субоптимално ниво на 25ВД.

### **3.3.3. Ренопротекция**

Албуминурията е един от основните фактори за прогресия на ХБЗ, както и предиктор за сърдечносъдови инциденти и смърт (124), поради което намаляването и е основна цел при болен с ХБЗ. Проучването NHANES III показва връзката между ВД недостатъчност и по-високи нива на албуминурия (57), което насочва към независим антипротеинуричен ефект на ВД. Няколко клинични проучвания показват намаляване на протеинурията при използване на ВД аналози (10, 12, 72, 58). Ренопротекцията вероятно се осъществява по няколко механизма. Първият – потискане на РААС беше вече разгледан подробно. Следващият нефропротективен механизъм е потискане синтеза на нуклеотиден фактор κВ (НФ κВ). Този фактор регулира експресията на широк кръг от гени,

свързани с възпаление, пролиферация, фиброза (93). ВД потиска активирането на НФ κВ чрез блокиране свързването му с ДНК (216). Серумното ниво показва негативна връзка с процеса на бъбречно възпаление при редица заболявания (244). ВД анализите потискат НФ κВ и намаляват възпалението при заболяванията като обструктивна нефропатия, циклоспоринова нефротоксичност, гентамицинова токсичност (220, 182, 183). На молекулно ниво 1,25ВД потиска експресията на ангиотензиноген и инхибитора на плазминоген активатора тип 1, която забавя прогресията на бъбречното увреждане (59, 246, 41).

Блокирането на Wnt/β-catenin-овият механизъм е друга възможност за обясняване на ренопротективните ефекти. Активирането на този механизъм води до албинурия при експериментални модели (53). Комплексът 1,25ВД - ВДР блокира този път чрез блокиране ядрената трансплокация на β-catenin (179, 207). Приложението на ВД аналози води до намаляване на протеинурията при експериментални модели чрез блокиране ефекта на β-catenin (98).

Последният дискутиран механизъм е директно повлияване експресията на протеините от слит – диафрагмата между подоцитите, които предпазват от масивно преминаване на белтъчни молекули при гломерулна филтрация. Проучванията показват, че при ЗД експресията на тези молекули се намалява, а терапията с ВД блокира потискането на генната експресия (247,61). ВД влияе на този процес чрез стимулиране на гените на белтъците от слит – диафрагмата или чрез намаляване на подоцитната загуба. Експериментални модели доказват повишена експресия на нефрин (основен белтък на слит-диафрагмата) при приложение на ВД (199, 219). Доказан е и ВДРЕ в гена за нефрин (62). Тези данни дават допълнителна информация за антипротеинуричните ефекти на ВД чрез запазване целостта на слит диафрагмата.

### **3.3.4. Захарен диабет, метаболитен синдром и ВД**

Нараства броят на публикациите, свързващ дефицита на ВД и развитието на ЗД I и II тип (157, 204, 74, 184, 250, 28). Доказано е наличието на ВДР и СУР27В1 в бета клетките на панкреаса (23). Лечението с ВД води до подобряване на глюкозния метаболизъм и намаляване инсулиновата резистентност, докато ВД дефицит води до намаляване секрецията на инсулин (181, 234, 29). Тези ефекти се базират както на геномни промени в β клетките, така и на негеномни ефекти – промяна в трансмембранный пре-

нос на калциеви йони, което води до подобрена секреция и действие на инсулин (172, 148). Допълнителен механизъм за повлияване на глюкозният метаболизъм от ВД е подобряване експресията на рецептора за инсулин, подобряване на инсулиновия отговор и намаляване на системното въз-паление (189, 151, 152). Въпреки посочените данни за положителното влияние на ВД при ЗД – тип 1 и 2 , все още има неяснота по отношение на това кой трябва да се профилактира и в каква доза. Предпо-лага се, че ранното начало на профилактика на ВД недостатъчност след раждане или при бременни и кърмещи жени ще доведе до намаляване честотата на ЗД тип 1 (195, 90). Опитите за добавяне на ВД към терапията на ЗД тип 1 досега са неуспешни (90).

Доказано е влиянието на мастната тъкан върху метаболизма на ВД. Интересен е факта, че системата на ВД може от своя страна да влияе на метаболизма на адипоцитите, като молекулната база на това взаимодействие е наличието на ВДР и СУР27В1 в адипоцитите (42, 239, 138, 131, 119). 1,25ВД потиска адипогензата и намалява натрупването на липиди в адипоцитите (63). Активирането на ВДР води до инхибиране диференциацията на преадипоцитите към адипоцити, като полиморфизми във ВДР се свързват с увеличена честота на за-тлъстяване при хора (131, 176).

### **3.3.5. ВД статус и имунитет**

Доказано е наличието на рецептор за ВД и СУР27В1 активност в клетките на имунната система – дендритни клетки, макрофаги, В – и Т лимфоцити (52). ВД потиска пролиферацията на В-лимфоцити, блокира диференциацията им и секрецията на имуноглобулини (135, 39). ВД потиска пролиферацията и на Т-лимфоцитите, като тя се измества към Th2 – фенотипа, а също така матурацията се променя в посока с намалено образуване на Th 17 – лимфоцити (19, 159, 27, 221, 54). В резултат е налице намален синтез на инфламаторни цитокини (IL-17, IL21) и увеличаване на противовъзпалителни такива (IL10). ВД потиска образуването на инфламаторни цитокини от моноцитите и потиска диференциацията на дендритните клетки (187, 91, 217).

#### **А. Стимулиране на протективен имунитет**

Ниските нива на ВД са свързани с по-висока честота на инфекции на горните дихателни пътища, а ВД е използван в лечението на туберкулоза през 19-и век (237, 82, 133). По-висока честота на грип, бактериална вагиноза и HIV се отбелязва при пациенти с ВД недостатъчност (35, 25, 233, 196). Макрофагите разпознават липополи-захаридите

на бактериите чрез т.нар. toll-подобни рецептори (TLR). В резултат на това се синтезират бактерицидните пептиди кателоцинин и  $\beta$  дефензин 4 (75) Гените за тези пептиди имат ВДРЕ в своята структура. Освен това активирането на TLR води до увеличена експресия на ВДР и СУР27В1 в макрофагите (143, 236).

#### Б. ВД и автоимунни заболявания

В последните години нараства броят на епидемиологичните проучвания, доказващи връзката между субоптималните нива на ВД и автоимунни заболявания като мултиплирена склероза (МС), ревматоиден артрит (РА), болест на Крон, хроничен улцерозен колит, системен лупус еритематодес (СЛЕ) (9). Ниски нива на ВД са свързани с развитието на заболявания като РА, МС, автоимунен ЗД (171, 142, 163). Проучване на Zold и сътр. Показва, че ниските нива на 25ВД се свързват с ускорена прогресия на болестта при пациенти с недиференцирана съединителнотъканна болест (251). В допълнение, налице е обратна връзка между активността на автоимунните заболявания и нивото на 25ВД (48, 211, 50, 185).

Описаните ефекти се обясняват със споменатите промени в дендритните клетки и лимфоцитите при активиране на ВДР, а също така и стимулиране на CD25+CD24+ Т супресорни лимфоцити, които потискат активирането на Т хелперите от тип 1 (9).

### 3.3.6. Противотуморна активност на ВД

Още през 1981 год проучванията показват потискане на пролиферацията на меланомни клетки *in vitro* от 1,25ВД, а в последствие същото се доказва при миши и човешки миелоидни левкемични клетки (47, 166, 7). В последствие се натрупват данни за антипролиферативен ефект на ВД при ракови клетъчни линии на млечна жлеза, простата, дебело черво (180, 130, 34). Доказано е освен това, че редица нормални и малигнени тъкани могат да синтезират 1,25 ВД от 25ВД, притежават ВДР, поради което 1,25ВД има автокринна и паракринна функция в тези тъкани (110, 222, 51).

Най-често антипролиферативните свойства на ВДР са свързани с блокиране на клетъчният цикъл на ниво G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Друг механизъм е стимулиране експресията на инхибиторите на клетъчния цикъл p21<sup>(waf1/cip1)</sup> и p27<sup>(kip1)</sup> (226). Трета антипролиферативна възможност е индуциране на апоптозата, особено при епителни клетки от млечната жлеза (24), а също така и потискане на съдовия ендотелен фактор, като по този начин потиска ангиогенезата при туморните заболявания (155).

Редица епидемиологични проучвания доказват връзката между ВД статуса и честотата на някои ракови заболявания. Garland и сътр. доказват обратната корелация между интензивността на слънчево-то греене и риска от рак на млечна жлеза, простата, дебело черво (78, 77, 147, 84, 203, 116). Доказан е и синергичен ефект на 1,25ВД с химиотерапевтици (101, 170, 100, 149). Националната Академия на Науките на САЩ препоръчва ВД суплементация с целево серумно ниво на 25ВД поне 75nmol/L за профилактика на аденом и рак на дебело черво (190, 89, 96, 154). Нивото на 25ВД обаче не трябва да превишава 220nmol/L. Въпреки оптимистичните данни от проучванията ВД суплементацията не е залегнала в рутинната противотуморна профилактика (76).

### **3.3.7. Други ефекти на ВД**

#### **А. Влияние върху мускулната сила**

Дефицитът на ВД води до мускулна слабост. Скелетните мускули притежават ВДР и се нуждаят от ВД за оптимално функциониране (107, 108). Покачването на серумното ниво на 25ВД от 10 на 40 nmol/L води до подобряване на мускулната сила и скорост, като по-добрението персистира при покачване на нивото на 25ВД до 100 nmol/L (108). Налице е и намаляване честотата на паданията при болни с коригирани 25ВД нива (20, 32).

#### **Б. Повлияване на централната нервна система (ЦНС)**

ВД недостатъчността се свързва с повишена честота на шизофрения и депресия. Поддържане на оптимално ниво на 25ВД *in utero* и в ранният постнатален период вероятно е от значение за поддържане транскрипционната активност на ВДР, което вероятно е от значение за развитието на мозъка и мозъчната дейност в по-късните етапи от живота (160, 85, 69).

#### **В. Белодробен ефект**

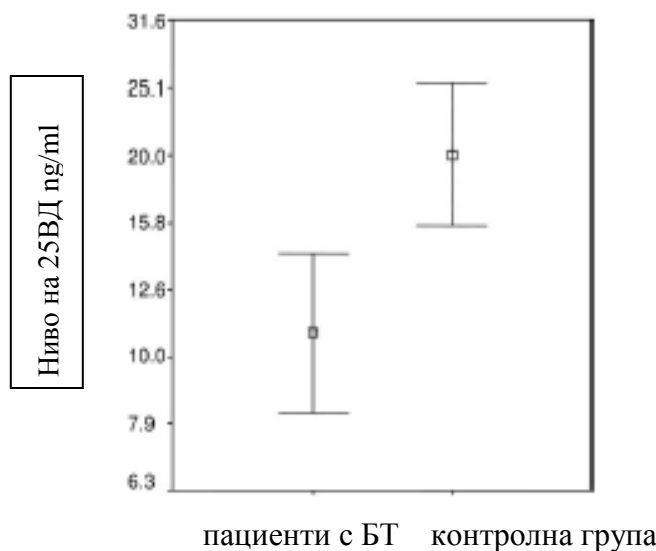
При мъже и жени се отчита покачване на ФЕО<sub>1</sub> с 176 мл при болни с ниво на 25ВД над 87nmol/L (22). При децата на майки с ВД дефицит по време на бременност се отчита по-висока честота на астма (33).

### 3.4. Витамин Д и бъбречна трансплантация

#### 3.4.1. Нарушения във ВД статуса при БТ

При пациенти с БТ е налице висока честота на субоптимални нива на ВД, като нивото е значимо по-ниско от общата популация (191, 156) (фигура 10).

Фигура 10. Средно ниво на 25ВД при пациенти с бъбречна трансплантация и контролна група (Querings et al), 1 ng/ml = 2.5nmol/L



Факторите за този резултат са комплексни. Налице е редуциран синтез на ВД в кожата с оглед на намаленото излагане на директна слънчева светлина и използването на слънцезащитни средства като профилактика на кожни карциноми. При пациентите с БТ е налице висока честота на ХБЗ (201, 49), протеинурия (14, 129), затлъстяване (213, 186) които са независими фактори за ВД недостатъчност. Висока е и честота на новооткрит захарен диабет след БТ (NODAT), между 10 и 30% от възрастните пациенти лекувани с калциневринови инхибитори (КНИ) и стероиди (240, 6, 87, 16). В допълнение, след БТ голямо значение има и имunosупресивната терапия, най-вече лечението с кортикостероиди. Кортикостероидите активират 24-хидроксилазата чрез активиране рецептора за Pregnane X, което води до разграждане на 25ВД (13), фиг. 8. Друг рисков фактор е лечението с калциневринови инхибитори. Еуал и сътр. Съобщават за по-ниски нива на серумен 25ВД при бъбречнотрансплантаци, лекувани с Такролимус (ТАК) и микофенолат мофетил (ММФ) (68). Данните относно връзката между 25ВД и други имunosупресори на този етап са недостатъчни. Факторите влияещи на нивото на 25ВД след БТ са отбелязани в таблица 5.

Таблица 5. Фактори, влияещи на нивото на 25ВД след БТ

Намален синтез в кожата
Ограничаване излагането на слънце Използване на слънцезащитни средства
Намален внос
Намален белтъчен внос с оглед висока честота на ХБЗ
Намалена бионаличност
Висока честота на затлъстяване
Увеличена загуба
Висока честота на протеинурия
Намалена резорбция
Висока честота на захарен диабет
Увеличен катаболизъм
Имуносупресивна терапия – кортикостероиди Други имуносупресори – калциневринови инхибитори, ММФ

С оглед на редицата неизяснени предиктори на ВД нивото при трансплантирани, поради което проучванията в тази насока са с голямо практическо значение. В настоящият труд за първи път се определя честотата на ВД недостатъчност при бъбречнотрансплантирани, за първи път се изучават факторите, повлияващи нивото на 25ВД при тази група болни България. По този начин се откриват високорискови подгрупи за ВД дефицит след тези болни, при които може да се проведе адекватна профилактика.

### **3.4.2. Значение на ВД при пациенти с бъбречна трансплантация**

Описаните по-горе многостранни ефекти на ВД, както и високата честота на 25ВД недостатъчност след БТ демонстрират важността на ВД статуса при тези болни. Според препоръките на KDIGO нивото на 25ВД е удачно да се проконтролира при всички пациенти с БТ, независимо от степента на ХБЗ , с оглед на високата честота на ВД недостатъчност. (123, 126).

Описаните по-горе многостранни ефекти на ВД, както и високата честота на 25ВД недостатъчност след БТ демонстрират важността на ВД статуса при тези болни. Според препоръките на KDIGO нивото на 25ВД е удачно да се проконтролира при всички пациенти с БТ, независимо от степента на ХБЗ, с оглед на високата честота на ВД недостатъчност. (123, 126).

#### А. Витамин Д и калциево-фосфорна обмяна след БТ

При добре работещ графт в ранния посттрансплантационен период при част от болните настъпва спонтанна корекция на хиперпаратиреоидизма и ниските нива на 1,25 дихидроксивитамин Д. Високата честота на субоптимални нива на 25ВД и 1,25 ВД водят до не само до малабсорбция на калций и влошаване на вторичен хиперпаратиреоидизъм, но и до костни минерализационни дефекти, вкл. изявена остеомаляция (164, 4).

Изследването на 25ВД е желателно да се проведе след трети месец от БТ. Корекцията на нивото става по аналогичен начин на този при общата популация (123). Таблица 6 обобщава проследяването на биохимичните показатели, вкл. и 25ВД в следтрансплантационния период след 3-и месец (126).

Таблица 6. Честота на изследване на биохимичните показатели на калциево-фосфорната обмяна след трансплантация (след 3 месец).

Показатели	Честота на изследване при ХБЗ		
	1 – 3Т ст	4Тст	5Т ст
Калций, Фосфор	6-12 месеца*	3-6 месеца	1-3 месеца
ПТХ	6-12 месеца*	3-6 месеца	1-3 месеца
25ВД	Изследване на базова стойност и последващи изследвания според нивото и приложеното лечение.		
АФ	При степени 3Т - 5Т - поне веднъж годишно или често при завишен ПТХ		

\* - интервалите зависят от началите стойности и прогресията на ХБЗ.

Според работната група на KDIGO за диагностика и лечение на минерално-костни нарушения вързани с ХБЗ, до момента няма достатъчно проучвания, оценяващи ефективността на терапията с ВД при бъбречнотрансплантирани, които покриват изиск-

ванията на работната група. От проведенният мета-анализ на различни пациентски популации с продължителен прием на кортикостероиди се установява положителен ефект от приема на ВД върху костната плътност на лумбалните прешлени. Ето защо KDIGO препоръчва корекция на субоптималните нива на 25ВД, особено с ниска костна плътност (123).

#### Б. Плейотропни ефекти

Описаният имуномодулаторен ефект е с голямо значение при БТ. Ретроспективни проучвания демонстрират подобрена функция и подобрена преживяемост на трансплантата при пациенти лекувани с 1,25 ВД, като наблюденията са валидни и за други видове органна трансплантация (175, 194, 134). Проучванията показват намалена функция на графта и преживяемост на пациента при субоптимални нива на 1,25ВД, а Redaelli и сътр. описват адитивен имуномодулаторен ефект на 1,25ВД и циклоспорин А (ЦсА) (70, 193).

След БТ е налице по-висока честота на инфекциозни и малигнени заболявания поради използваната имуносупресивна терапия. Налице е повишена честота на ХБЗ (201, 49), протеинурия (14, 129), ЗД (240, 6, 87, 16) и на сърдечно-съдови заболявания (5, 125, 177). Адекватната суплементация с ВД не само ще коригира персистиращите костни промени, но се вероятно ще повлияе РААС, честотата на сърдечносъдовите заболявания (ССЗ), малигнени заболявания при тази група болни, което ще доведе до подобрена преживяемост на графта и пациента като цяло. Наличните публикации в тази насока демонстрират намаляване на протеинурията при пациенти с ХБЗ (72, 11) В тези проучвания не са включени бъбречно трансплантирани пациенти. Таблица 7 демонстрира възможните плейотропните ефекти на ВД след БТ.

До момента няма рандомизирани клинични проучвания при бъбречнотрансплантирани, оценяващи влиянието на ВД суплементацията върху крайни резултати, освен костно здраве. Няма яснота и за нужните целеви стойности за нивото на 25ВД за проявяване на плейотропните му ефекти, както и за адекватен терапевтичен режим (123). Налице са само препоръки на някои автори за суплементация с оглед повлияване на калциево-фосфорната обмяна, при която се целят стойности над 75 pmol/L и дневен прием на ВД - поне 800IU/дневно (120, 164). Въпреки редицата неясноти относно плейотропните ефекти на ВД при пациенти с БТ, работната група на KDIGO препоръчва корекция

на нивата на 25ВД, с оглед високата честота на ВД недостатъчност и положителният ефект при нетрансплантирани болни (123).

Табл.7. Плейотропни ефекти на ВД при пациентите с БТ

Повлияване на противоинфекциозен имунитет
Подобряване на антитуморна защита
Синергизъм с имуносупресивната терапия
Потискане на РААС
Ренопротективен ефект
Оптимизиране на гликемичен контрол
Намаляване честотата на ССЗ

В настоящата научна работа за първи път в България се разглежда клиничното значение на серумните нива на 25ВД за пациентите с БТ, като се търси връзката на серумните 25ВД концентрации със заболявания, водещи до намаляване преживяемостта на трансплантата и на пациента – епизоди на реакции на отхвърляне, ниво на протеинурия, малигнени заболявания, хронични уроинфекции, обща смъртност. Акцент се поставя на плейотропните ефекти на ВД, както и на ефективността на прилаганата до момента суплементация.

## **4. Цел. Задачи.**

### **4.1.Цел**

Цел на настоящата работа е оценка на ВД статуса при пациенти с бъбречна трансплантация в България, откриване на факторите, влияещи върху нивото на 25ВД в тази популация и установяване на плейотропни ефекти на ВД

### **4.2.Задачи**

Поставени бяха следните задачи :

1. Оценка честотата на ВД недостатъчността при пациенти с БТ
2. Откриване на факторите, влияещи на нивото на 25ВД
3. Описване на сезонните промени в 25ВД при бъбречнотрансплантирани
4. Доказване влиянието на имunosупресорите върху ВД статуса
5. Доказване влиянието на ЗД и гликемичният контрол върху нивото на 25ВД
6. Оценка влиянието на 25ВД върху протеинурията след БТ
7. Оценка влиянието на 25ВД върху други заболявания при пациенти с БТ (неоплазии, реакция на отхвърляне, хронични уроинфекции, )

## **5. Материали и методи**

### **5.1. Материали**

#### **5.1.1. Подбор на пациентите**

395 пациента с бъбречна трансплантация бяха тествани първоначално за 25ВД по време на редовните прегледи към Диспансер по Бъбречна трансплантация към Клиника по Нефрология и трансплантация, УМБАЛ «Александровска» в периода от 1.05.2012 до 31.10.2012год. Тестуването за ВД се проведе по време на редовните прегледи към ДБТ, при които освен лабораторните резултати се оцени още АН на болния, клинично състояние, проведе се и ехографски преглед на трансплантата.

За оценка на факторите, влияещи върху нивото на 25ВД, бяха селектирани болните с давност на БТ над 6 месеца, без анамнеза за оперативно лечение на вторичен хиперпаратиреоидизъм, стабилна бъбречна функция и без съвместен прием на калциневринови инхибитори (КНИ) и mTOR – инхибитори (mTORI). Пациентите с напреднало чернодробно заболяване (степен по Child-Pugh B и C), активна чернодробна болест (покачване на АсАТ, АлАТ,  $\gamma$ ГТ поне два пъти над нормалните стойности), ВД суплементация, както и трансплантирани с екстремни стойности за ПТХ, ИТМ, 25ВД също бяха изключени при оценката тези фактори. При разглеждане влиянието на сезонността и ЗД болните бяха допълнително селектирани, като селекционните критерии ще бъдат описани в съответните подглави

#### **5.1.2. Подбор на детерминантите на 25ВД**

Бяха оценени всички фактори, с вероятност за влияние върху нивото на 25ВД – демографски фактори (пол, възраст, време след БТ, ИТМ), сезонност (време на тестване за 25ВД), биохимични показатели (калций, фосфор, серумен албумин, ниво на ПТХ, изчислена гломерулна филтрация). Включени бяха още и придружаващи заболявания - неоплазия и РО в рамките на 12 месеца от тестването за 25ВД, ЗД, използвани имunosупресивни медикаменти (КНИ, mTORI, азатиоприн, микофенолови производни, прием на стероиди пер ос, пулсово лечение със стероиди в рамките на 12 месеца преди изследването за 25ВД). Всички тествани детерминанти са представени в таблицата по-долу.

Таблица 8. Тестувани маркери

Демографски фактори
Пол
Възраст
Етническа принадлежност
Време от БТ
Други базови данни
ИТМ
Менопауза
Време на изследване за 25ВД
Стандартни лабораторни показатели
Серумен креатинин
Изчислена гломерулна филтрация
Серумен калций (коригиран)
Серумен фосфор
Серумен албумин
Протеинурия
РТН
Алкална фосфатаза
Придружаващи заболявания
Туберкулоза
Реакции на отхвърляне (12 месеца преди изследването)
Неоплазии (12 месеца преди изследването за 25ВД)
Прием на други медикаменти, нарушаващи ВД метаболизъм
Наличие на напреднало или активно чернодробно заболяване
Наличие на хепатит С (HCV)
Наличие на хепатит В (HBV)
Репликация на HBV/HCV при наличие на болестта
Остри уроинфекции
Хронични уроинфекции (над 3 епизода за 12 месеца)

Наличие на захарен диабет
<b>ВД суплементация</b>
Суплементация с ВД <sub>3</sub> – доза, продължителност
Суплементация с 1,25ВД – доза, продължителност
Суплементация с аналози на рецептора за ВД – доза, продължителност
<b>Имуносупресивна терапия</b>
Прием на Циклоспорин А
Ниво на Циклоспорин А
Прием на Такролимус
Ниво на Такролимус
Прием на стероиди
Стероидни пулсове (до 12 месеца преди тестване за 25ВД)
Прием на микофенолати
Прием на Азатиоприн
Прием на Сиролимус
Ниво на Сиролимус
Прием на Еверолимус
Ниво на Еверолимус

### 5.1.3. Подбор на състоянията, повлиявани от ВД

С оглед на многото плейотропни ефекти на ВД, решихме да оценим влиянието на ВД върху редица лабораторни показатели и заболявания с най-голямо значение за преживяемостта на графта и пациента. От лабораторните резултати бяха избрани нивото протеинурията и изчислената гломерулна филтрация (иГФ). иГФ се определи чрез изследване на серумен креатинин по ензимен метод и използване на формулата СКД-ЕРІ. Оцени се връзката между нивото на 25ВД и честотата на водещи заболявания, повлияващи преживяемостта на графта (често рецидивиращи уроинфекции, над 3 епизода годишно; честота на РО), както и влиянието на 25ВД и честотата на малигнени заболявания.

## 5.2. Методи

### 5.2.1. Изследване на 25ВД в плазма чрез валидизиран LC-MS/LCметод

Определянето на 25ВД се извършваше с валидиран LC-MS/MS метод след екстракция с хексан, използване на d325D<sub>3</sub> за вътрешен стандарт, C18 аналитична колона, положителна електроспрей-йонизация и проследяване на йонната реакция при следните m/z преходи: 401→383 за 25D<sub>3</sub>, 413→395 за 25D<sub>2</sub> и 404→386 за d325D<sub>3</sub>. Методът беше валидиран съгласно критериите на FDA и DEQAS сертифициран, с документиран селективност и ефект на матрицата, точност и възпроизводимост 7.5%; екстрационен добив 57-73%; линейна област 3.0-300.0 nmol/L, R<sup>2</sup>>0.99, стабилност при замразяване и размразяване за три цикъла от 24 ч, постпрепаративна стабилност 96 часа на 10°C, краткосрочна стабилност 24 часа на тъмно и 2 ч на светло; стабилност в разтвор и в плазма 5 дни на температура в диапазона 4-8°C, и 99 дни при температура -20°C.

Приетите стойности на 25ВД за дефицит, недостатъчност и достатъчност са обобщени в таблица 9.

Табл. 9. Стойности за ВД достатъчност, недостатъчност, дефицит

Състояние	25ВД серумно ниво
ВД достатъчност	>80 nmol/L
ВД недостатъчност – лека	50 – 79 nmol/L
ВД недостатъчност – изразена	25 – 49 nmol/L
ВД дефицит	<25 nmol/L

### 5.2.2. Определяне нивото на имunosупресорните медикаменти в кръв по LC-MS/LCметод

Определянето на ЦсА, Так, Сиролимус (Сиро) и Еверолимус (Еве) се извършваше с валидиран LC-MS/MS метод след клетъчна лиза с метанол/цинков сулфат, и екстракция с 1-хлорбутан, [D12]CsA (dCsA), Ascomycin (Asco), and [13c2d4]RAD001 (cdRAD) за вътрешни стандарти, C18 аналитична колона, положителна електроспрей-йонизация и проследяване на йонната реакция при следните m/z преходи: 1203→425 за CsA, 822→766 за TCR, 932→865 за SRL, 976→909 за ERL, 1215→437 за dCsA, 809→756 за Asco, и 982→915 за cdRAD. Методът е валидиран съгласно критериите на

FDA сертифициран в международна ASI система за оценка на пригодността, с документиран селективност и ефект на матрицата, точност и възпроизводимост 8.9%; екстрационен добив 65-76%; линейна област с  $R^2 > 0.99$ , стабилност при замразяване и размразяване за три цикъла от 24 ч, постпрепаративна стабилност 96 h на 10°C, краткосрочна стабилност 12 ч на тъмно и 6 ч на светло; стабилност в разтвор и в пълна кръв 7 дни на 4-8°C, и 120 дни на -20°C.

### **5.2.3. Изследване на кръвни и уринни показатели, определяне на бъбречна функция**

Определянето на серумният креатинин се осъществи по ензимен метод. Бъбречната функция се определи чрез изчисляване на гломерулната филтрация по формулата СКД-ЕPI от 2009 год, като изчисляването се осъществи чрез интернет калкулатор на [www.mdrd.com](http://www.mdrd.com). Всички останали кръвни и уринни показатели бяха изследвани със стандартни лабораторни методи.

### **5.2.4. Микробиологични изследвания**

За идентифициране на изолираните щамове са използвани конвенционални биохимични методи, автоматизирани и полуавтоматизирани системи за биохимична идентификация – miniApi (bioMerieux, France) и BBL Crystal (BD). Антибиотичната чувствителност е определена посредством дисково дифузионен метод, съгласно използвания в България CLSI стандарт (1).

Анализът на данните за антибиотичната чувствителност е извършен с помощта на програма WHONET, версия 5.6.

### **5.2.5. Оценка на ИТМ**

Оценката на индексът на телесна маса се осъществи чрез измерване на ръст и телесна маса на болните с БТ по време на редовните прегледи в ДБТ. Използваната формула е :

$$\text{ИТМ} = \text{телесна маса (кг)}/\text{височина}^2(\text{м})$$

Използвахме следните норми в оценката на телесната маса (Табл. 10)

Таблица 10. Категории на пациентите според ИТМ.

Категория	ИТМ
Поднормено тегло	под 18.5
Нормално тегло	18.5 - 24.9
Наднормено тегло	25.0 - 29.9
Затлъстяване Iст	30.0 - 34.9
Затлъстяване IIст	35.0 - 39.9
Затлъстяване IIIст	Над 40.0

### 5.2.6. Статистически анализ

В работата са използвани дескриптивен анализ, еднофакторен и многофакторен логлинеен регресионен анализ, както и Mann-Whitney U тест. Използва се статистическият пакет SPSS 11.5, прието ниво на значимост  $p < 0.05$ . За да се избегне получаването на подвеждащи резултати данните бяха проверени за екстремни стойности (англ. “outliers”) чрез метода Z-score. Като данни, които рязко се отличават от останалите бяха дефинирани такива със стойност на Z-score над  $+3.29$  и под  $-3.29$ .

С оглед наличието на хетероскедастичност бе използван естествен логаритъм от количествените данни за ИТМ, ПТХ, АФ и 25ВД.

## 6. Собствени проучвания

### 6.1. Основни показатели на общата популация от изследвани болни

От 1.05.2012 до 31.10.2012 год 395 болни бяха тествани за нивото на 25ВД при редовните профилактични прегледи към нашият трансплантационен център. Освен 25ВД при пациентите се проведеха клиничен преглед ( измерване на АН, измерване на ръст и телесна маса), кръвни изследвания – биохимия, пълна кръвна картина, уринни изследвания – уринен седимент, 24 часова протеинурия, микробиологично изследване на урина. Проведе се и мониториране нивата на имunosупресорите с тесен терапевтичен спектър – ЦсА, Так, Еве, Сиро.

### 6.1.1. Демографски данни

Преобладаващата част от изследваните пациенти са мъже (62.5%). Средната възраст на всички бъбречнотрансплантираните е 42.63 години, а средната давност на БТ в месеци е 93.67 месеца. По-детайлна информация за демографските данни и разпределението по пол е дадено в таблица 7.

### 6.1.2. Лабораторни данни

Данните за ИТМ, средно ниво на 25ВД и стойностите на иГФ (по формулата СКD-EPI) са представени в таблица 7. Средното ниво на 25ВД в цялата група е 58.784 nmol/L, но варира в широки граници – стандартно отклонение  $\pm 26.61$  nmol/L (табл 11).

Табл. 11. Базови демографски и лабораторни данни за общата популация, n=395.

	Мъже	Жени	Общо
	247	148	395
Възраст (години)	42.47 $\pm$ 12.81	42.91 $\pm$ 11.89	42.63 $\pm$ 12.46
Време след БТ (месеци)	91.66 $\pm$ 62.44	97.04 $\pm$ 64.11	93.67 $\pm$ 63.04
иГФ (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	63.35 $\pm$ 22.51	61.77 $\pm$ 26.80	62.76 $\pm$ 24.18
ИТМ	24.99 $\pm$ 4.37	23.69 $\pm$ 5.130	24.50 $\pm$ 4.70
Ниво на 25ВД (nmol/L)	63.28 $\pm$ 24.53	51.27 $\pm$ 25.69	58.78 $\pm$ 25.61

БТ – бъбречна трансплантация, ИТМ – индекс телесна маса, 25ВД – 25-хидроксивитамин Д

### 6.1.3.Имуносупресивна терапия

Основните групи имуносупресори, използвани при болните с БТ са КНИ (ЦсА, Так), mTOR-инхибитори (Еве, Сиро), цитостатици - азатиоприн (Аза), производни на микофеноловата киселина [Мико (Mycophenolate mofetil, Mycophenolate – sodium)], стероиди, стероидни пулсове в рамките на 12 месеца преди изследването за 25ВД.

Преобладават болните с тройна имуносупресивна комбинация (n=293, 74.18%), основно комбинация от КНИ, Мико, КС (n=229, 57.95%). 4 от пациентите са на четворна имуносупресивна терапия (КНИ, Мико или Аза, mTORI, КС), 1 пациент – само на ЦсА. Най-честата двойна комбинация е калциневринов инхибитор с микофенолат (n=59, 14.94%). Данни относно имуносупресорите, прилагани в общата група и комбинациите помежду им са детайлно описани в таблици 12 и 13.

Таблица 12. Имуносупресивни медикаменти, използване при пациентите с БТ, n=395.

Медикамент	Брой пациенти
ЦсА <sup>a</sup>	230
Так <sup>b</sup>	126
Еве <sup>c</sup>	7
Сиро <sup>d</sup>	40
Мико <sup>e</sup>	322
КНИ <sup>f</sup> +mTOR-инхибитори	9
Аза <sup>g</sup>	46
КС <sup>h</sup>	317
Пулс КС <sup>i</sup>	44

<sup>a</sup> - ЦсА – Циклоспорин А, <sup>b</sup> - Так – Такролимус, <sup>c</sup> Еве – Еверолимус, <sup>d</sup> - Сиро - Сиролимус, <sup>e</sup> - Мико – микофенолати, <sup>f</sup> КНИ – калциневринови инхибитори, <sup>g</sup> Аза – Азатиоприн, <sup>h</sup> КС – кортикостероиди, <sup>i</sup> пулс КС – пулсова терапия с кортикостероиди

Таблица 13. Имуносупресивни комбинации при пациентите с БТ, n=395.

Вид комбинация	Брой болни
Четворна комбинация	4
mTORI+КНИ+Мико+КС	3
mTORI+КНИ+Аза+КС	1
Тройна комбинация	293
КНИ+Мико+КС	229
КНИ+Аза+КС	35
mTORI+Мико+КС	23
mTORI+Аза+КС	1
mTORI+КНИ+КС	3
mTORI+КНИ+Мико	2
Двойна имуносупресивна терапия	97
КНИ+Мико	59
КНИ+Аза	8
mTORI+Мико	5
mTORI+Аза	1
mTORI+КС	9
КНИ+КС	14
КНИ+ mTORI	1
Единична терапия	1
ЦсА	1

#### 6.1.4. ВД статус на пациентите с БТ

От общо 395 болни само 74 са с ВД достатъчност (18.73%). Най-честото отклонение от нормата е лека ВД недостатъчност, която се открива в 163 от случаите (41.27%). Тежка ВД недостатъчност се доказва в 32.15% от болните (n=127), а ВД дефицит – в 7.85% от случаите (n=31). Фигура 11 обобщава данните за ВД статуса на общата група бъбречнотрансплантирани, като са дадени и за разпределението по пол. Преобладава броят на болните от мъжки пол в групите с по-добър ВД статус – ВД достатъчност и лека ВД недостатъчност. В групите с по-ниско ниво на 25ВД (тежка ВД недостатъчност и ВД дефицит) настъпва изравняване по пол между болните, като при болните с ВД дефицит преобладават пациентите от женски пол – вж. Фиг. 11.

#### 6.1.5. ВД суплементация

36 бъбречнотрансплатирани (9.11%) получават ВД суплементация. ВД суплементацията е 3 основни вида – холекалциферол (ВД<sub>3</sub>), калцитриол (1,25ВД), ВД-рецепторни аналози (ВДРА). Основната суплементация е с ВД<sub>3</sub> – 21 пациента, като най-честата дозировка е 5 мкг/дневно (200IU/дневно). Най-честата доза на 1,25ВД е 0.25мкг/дневно. Само 1 пациент е на ВДРА (ВДР активатор, Парикалцитол; 1 мг/дневно). Двама болни са били на комбинирано лечение с ВД<sub>3</sub> и калцитриол. Данните са ВД суплементацията са обобщени в таблица 14.

Табл. 14. ВД суплементация в общата популация на болни след БТ, n=36.

Група медикамент	Дневна доза	Брой пациенти
ВД <sub>3</sub>	2 – 10мкг	21
1,25ВД	0.125 – 0.75мкг	12
ВДРА	1мкг	1
Комбинирана терапия		
1,25ВД+ВД <sub>3</sub>	0.25мкг+5мкг	1
	0.25мкг+10мкг	1

Фигура 11. ВД статус в общата популация на пациенти с БТ, n=395.



ВД – витамин Д

### 6.1.6. Съпътстващи заболявания

В обследваната група болни е налице сравнително висока честота в отклоненията от нормалният ИТМ. 202 пациента са с нормален ИТМ (в рамките на 18.5 – 24.9). Наднорменото тегло (ИТМ 25.0 – 29.9) е най-честото отклонение от нормата (123 болни), следвано от поднормено тегло (ИТМ под 18.5) – 31 болни(7.85%).

По отношение на бъбречната функция, най-често срещаната степен на ХБЗ е IIст (n=161), последвана от ХБЗ IIIст (n=141). С напреднала ХБЗ (над IIст) а общо 177 болни.

В общата група се откриват още 3Д (n=40), пациенти с паратиреоидектомия (парциална/тотална) (n=20), напреднало чернодробно заболяване/активна чернодробна болест (n=24), реакции на отхвърляне в рамките на 12 месеца преди изследване за 25ВД (n=17). Допълнителна информация за придружаващите заболявания е показана в таблица 15.

Таблица 15. Придружаващи заболявания при болните след БТ, n=395

Заболяване	Брой болни
Захарен диабет	40
Паратиреоидектомия	20
Напреднала чернодробна болест/активно чернодробно заболяване	24
ХБЗ 3+ст	177
Наднормено тегло (ИТМ 25 – 29.9)	123
Затлъстяване Iст (ИТМ 30 – 34.9)	28
Затлъстяване II ст (ИТМ 35 – 39.9)	8
Затлъстяване IIIст (ИТМ над 40)	3
Поднормено тегло (ИТМ под 18.5)	31
Реакции на отхвърляне	17
Неоплазии	5

### 6.1.7.Заклучение

Общата популация болни с БТ, изследвана за 25ВД се характеризира със следните особености:

1. Висока честота на субоптимални 25ВД нива – над 80% от всички болни. По-леките форми на ВД недостатъчност и ВД достатъчност преобладават при мъже.
2. В групата преобладават пациентите от мъжки пол (62.53%)
3. Налице са големи вариации по отношение на бъбречна функция (иГФ), продължителност на БТ (в месеци), възраст на болните (в години).
4. Групата е с изразена хетерогенност по отношение препаратите, използвани за ВД суплементация; преобладаващата част от болните обаче е без заместителна терапия.
5. Откриват се редица заболявания, повлияващи ВД статуса - напреднала чернодробна болест, захарен диабет, напреднала ХБЗ, наднормена телесна маса
6. Доказа се изразена хетерогенност по отношение на използваната имunosупресивна терапия, особено при двукомпонентната терапия. Преобладава тройната имunosупресия в различни комбинации от медикаменти (74.18%).

С оглед на посочените по-горе наблюдения, както и фактът, че нивото на 25ВД се стабилизира около 6 месеца след БТ, за коректна оценка на факторите влияещи на ВД статуса след БТ се наложи селектирането на болните по критериите от точка 5.2.1. В допълнение пациенти с стойности на Z-score над +3.29 и под /-3.29/ по отношение на ниво на 25ВД, ИТМ и ПТХ не бяха включени в проучването.

## **6.2. ВД статус на селектираните пациенти с БТ**

### **6.2.1. Общи данни**

С оглед на установената висока честота на субоптимални нива на 25ВД в общата популация и имайки в предвид хетерогенността на тази група, селектирахме пациентите, като приложихме критериите от точка 5.2.1. Селектираха се 289 пациента с БТ, с давност на БТ над 6 месеца. Базовите характеристики на тази група болни е показана в таблица 16. Отново пациентите от мъжки пол преобладават в групата (n=189, 65.40%). Няма съществени разлики по отношение на бъбречна функция, възраст, давност на БТ между двата пола (съответно  $p=0.426$ ,  $p=0.833$ ,  $p=0.719$ ). Установява се значима разлика по отношение на ИТМ между двата пола – съответно  $24.86\pm 4.79$  при мъже и  $23.73\pm 4.79$  при жени ( $p=0.037$ )

Фигура 12. Разлика между ИТМ при мъже и жени, n=289.

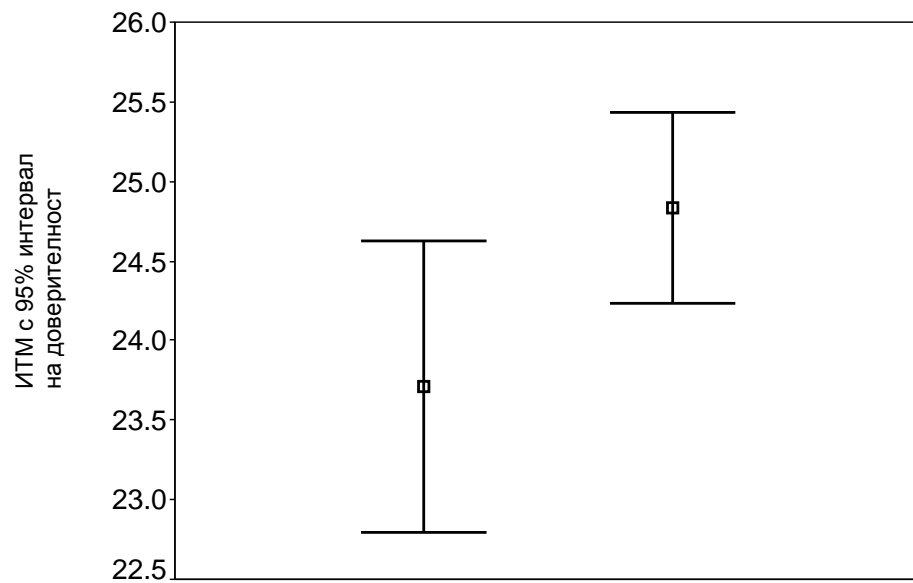


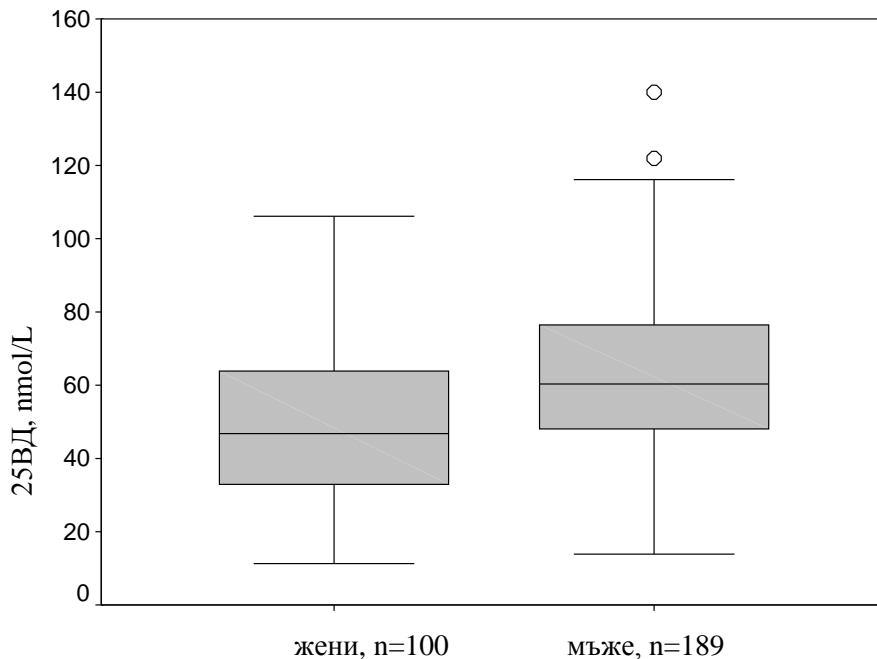
Таблица 16. Базови данни за селектираната група бъбречнотрансплантирани, n=289

	Мъже	Жени	Общо
	189	100	289
Възраст (години)	42.80±13.12	42.47±11.59	42.69±12.59
Време след БТ <sup>a</sup> (месеци)	92.84±61.42	95.61±63.79	93.80±62.16
иГФ <sup>b</sup> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	63.11±21.37	65.40±26.36	63.90±23.19
ИТМ <sup>c</sup>	24.86±4.79	23.73±4.79	24.44±4.38
25ВД ниво <sup>d</sup> (nmol/L)	63.97±23.31	49.73±21.02	59.04±23.51

<sup>a</sup> БТ – бъбречна трансплантация, <sup>b</sup> иГФ – изчислена гломерулна филтрация (формула СКД-ЕPI), <sup>c</sup> ИТМ – индекс телесна маса, <sup>d</sup> 25ВД – общ 25 хидроксивитамин Д

Налице е съществена разлика между средните нива на 25ВД, като при мъжете се отчитат по-високи стойности, въпреки по-високата стойност на ИТМ – вж. фиг. 13.

Фигура 13. Средни стойности на 25 хидроксид витамин Д при мъже и жени с БТ, n=289



Взаимоотношението между пол и ВД статус ще бъде разгледано подробно по-нататък в изложението.

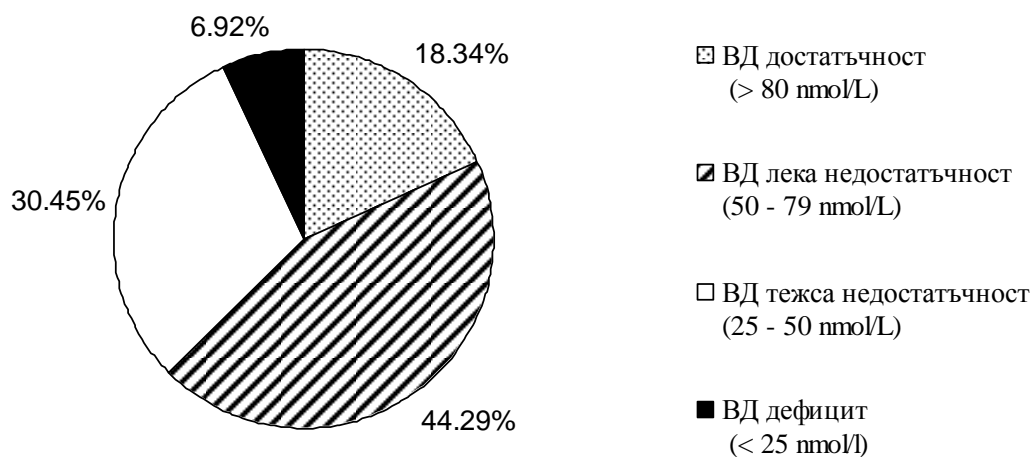
### 6.2.2. Честота на ВД недостатъчност

Въпреки че изследването на серумният 25ВД се осъществява извън сезонният надир на ВД (февруари – март), над 80% от болните са с различни форми на ВД недостатъчност (лека, тежка, ВД дефицит). Резултатите потвърждават находката от общата изследвана популация.

Само 53 пациента са с ВД достатъчност. Отново леката ВД недостатъчност е най-честото отклонение от нормата. Обобщен ВД статуса в селектираната популация е представен във фигура 14.

Фигура 14. ВД статус в селектираната група болни с БТ, n=289.

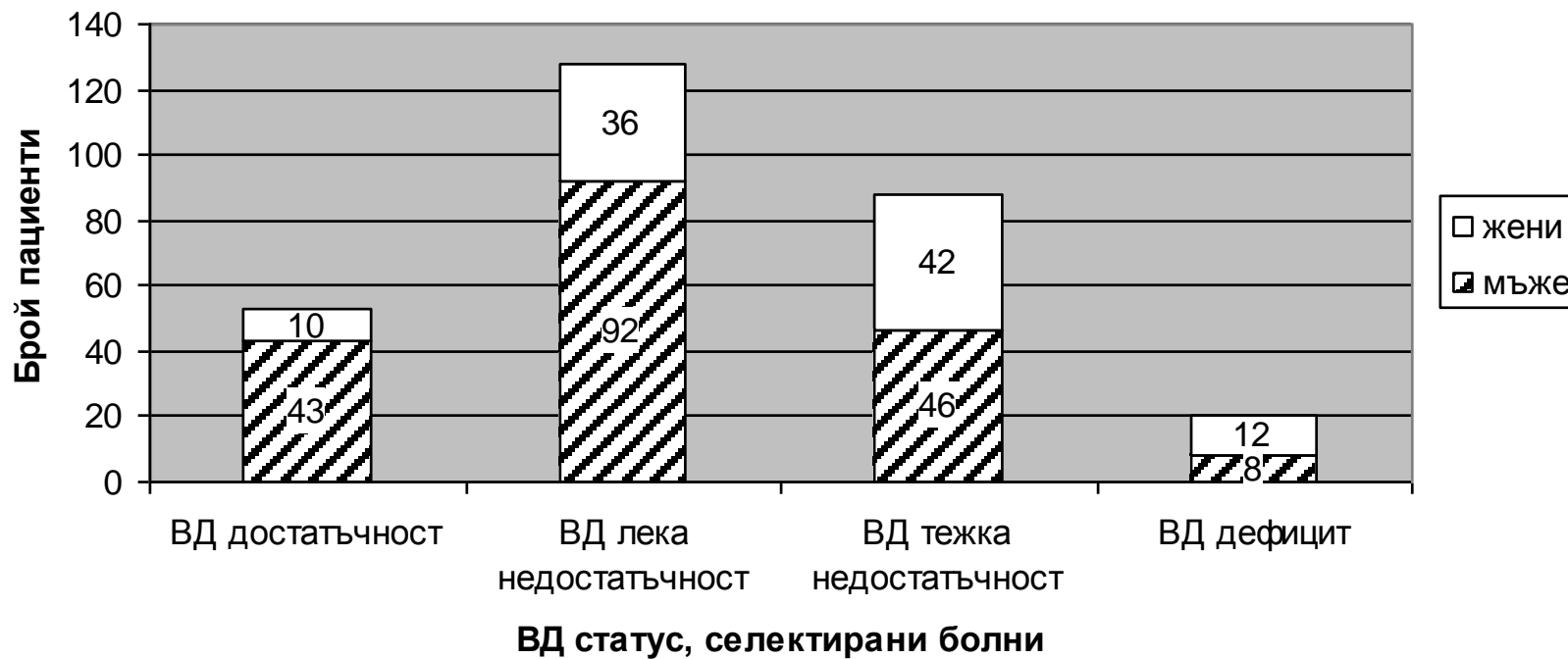
## КИИ



ВД – витамин Д

И тук се отчита по-висока честота на ВД достатъчност при мъжете, като броят на мъжете с ВД достатъчност е над 4 пъти по-голям от този на жените. Резултатите в полза на пациентите от мъжки пол се запазват и при лека ВД недостатъчност [Мъже(М): Жени (Ж) = 92:36]. При по-тежките отклонение във ВД статуса се отбелязва изравняване на отношението между половете, като в групата с ВД дефицит жените преобладават (фиг. 15).

Фигура 15. ВД статус и отношение мъже:жени, n=289.



### **6.2.3. Заключение**

Селектираната група болни (n=289) е със сходни показатели по отношение на отношение М: Ж, възраст на болните, давност на трансплантацията спрямо общата популация; отчита се и сходна честота на ВД недостатъчност – и в двете групи под 20% от пациентите са с ВД достатъчност. ВД статусът има сходен профил по отношение на половите различия с общата популация – леките нарушения и ВД достатъчността преобладават при мъжете, докато при по-тежките промени настъпва изравняване между половете.

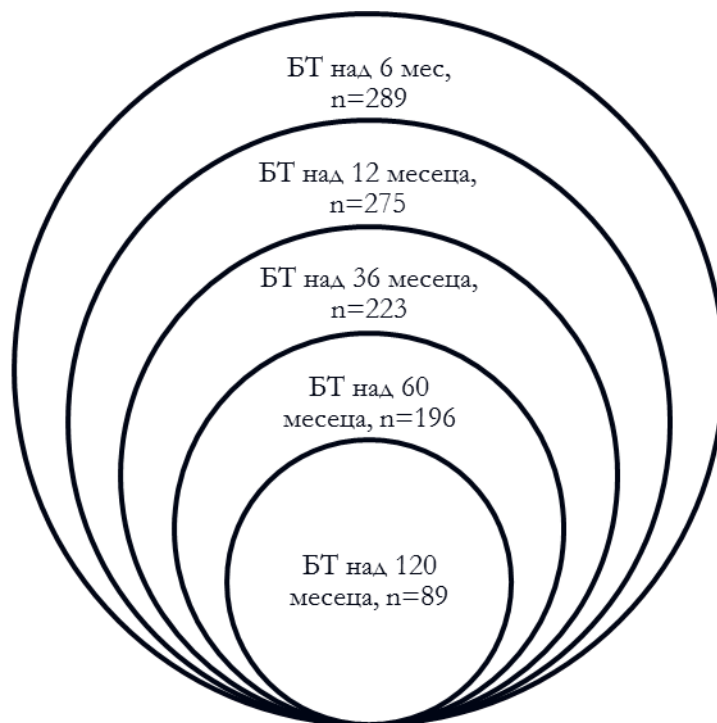
### **6.3. Фактори влияещи на нивото на 25ВД в различни периоди след БТ**

ВД статусът се влияе от множество фактори описани в литературния обзор. За изолиране на факторите, повлияващи на нивото на 25ВД освен адекватен подбор на пациентите с оглед на описаната хетерогенност се налага и адекватен подбор на възможните предиктори на 25ВД. За оценката използвахме едно - и многофакторен регресионен анализ с прието ниво на значимост  $p < 0.05$ . Първоначално се оцениха демографските фактори (пол, етнос, възраст, продължителност на БТ). В последствие към тези фактори се допълниха фактори, за които предварително са публикувани данни за влияние върху 25ВД – наличие на ЗД, затлъстяване, време на изследване за 25ВД (сезонност), бъбречна функция, протеинурия. Най-накрая се добавиха и фактори, за които все още няма достатъчно данни за влияние върху нивото на ВД, повечето от които са специфични за пациентите с БТ – имunosупресивна терапия (КНИ, mTOR – инхибитори, цитостатици, кортикостероиди пер ос, КС – пулс терапия), влияние на нивото на имunosупресорите върху 25ВД, честота на епизоди на реакция на отхвърляне (в рамките на 12 месеца преди изследването за 25ВД), неоплазии (до 12 месеца от изследването за 25ВД), хронични уроинфекции (над 3 епизода годишно). Резултатите от регресионният анализ са обобщени в таблица 15.

Основната група, с която работим в нашата работа е селектираната с давност на БТ поне 6 месеца – първа селектирана група (ПСГ). За да оценим кои фактори влияят на 25ВД в по-късни етапи след БТ, проведохме регресионен анализ на пациентите с дав-

ност на БТ съответно над 12, над 36, над 60 и над 120 месеца. На диаграма 1 са показани подгрупите болни, селектирани в рамките на първата селектирана група, според давността на БТ.

Диаграма 1. Подгрупи от пациенти с БТ според давността на трансплантацията



### 6.3.1. Резултати от регресионен анализ: давност на БТ над 6 месеца

Факторите, изолирани от регресионният анализ са обобщени във таблица 17.

Табл. 17. Фактори, влияещи на 25ВД при пациенти с БТ след 6<sup>и</sup> месец от БТ, n=289

	B	S.E.	P
Свободен член $\alpha$	5.812	0.456	<0.0001
Жени	-0.342	0.051	<0.0001
Юли	0.283	0.099	0.005
Август	0.437	0.084	<0.0001

Септември	0.329	0.079	<0.0001
Захарен диабет	-0.209	0.079	0.009
ln ИТМ	-0.885	0.329	0.008
Циклоспорин А	-0.164	0.078	0.037
Такролимус	-0.162	0.082	0.049

ln ИТМ – естествен логаритъм от ИТМ, SE – стандартна грешка

С най-голямо влияние върху 25ВД (най-висока абсолютна стойност на коефициента  $\beta$ ) е ИТМ ( $\beta=-0.885$ ), последван от женски пол и сезонност на тестване за 25ВД (месеците Юли, Август, Септември). На трето място по значимост е наличие на ЗД ( $\beta=-0.209$ ,  $p<0.01$ ). Най - слабо влияние се отчита за КНИ. Данните показват, че тестване за ВД през Юли, Август, Септември има значима положителна връзка с ВД статуса. Високият ИТМ, женският пол, приемът на КНИ, наличието на ЗД са състояния свързани с по-ниски нива на 25 ВД.

### 6.3.2. Резултати от регресионен анализ давност на БТ над 12 месеца

След увеличаване на минималната давност на БТ бяха селектирани 275 болни (М 182, Ж 93). Установиха се приблизително равни показатели за средна възраст, бъбречна функция и ИТМ между двата пола (съответно  $p=0.912$ ,  $p=0.641$  и  $p=0.098$ ). При жени се установи по-дълга давност на БТ (статистически незначима разлика,  $p=0.432$ ) и по-ниско ниво на 25ВД ( $p<0.05$ ). Показателите са посочени в табл. 18.

Табл. 18. Базови данни за пациентите с БТ над 12 месеца,  $n=275$ .

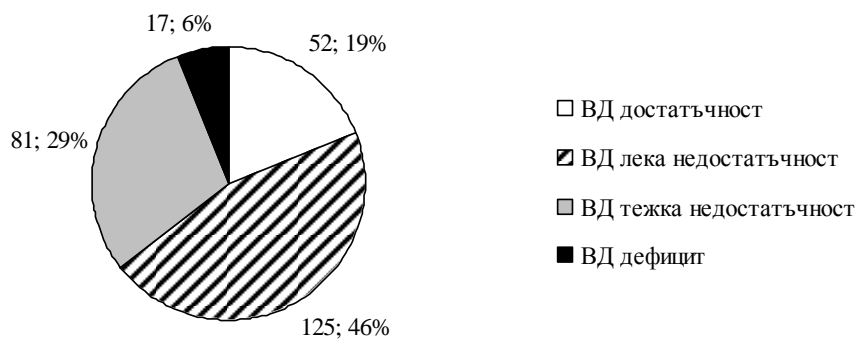
	Мъже	Жени	Общо
	182	93	275
Възраст (години)	43.09±13.18	42.91±11.68	43.03±12.67

Време след БТ <sup>a</sup> (месеци)	96.05±60.32	102.14±61.34	98.11±60.63
иГФ <sup>b</sup> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	63.00±21.57	64.39±26.16	63.47±23.18
ИТМ <sup>c</sup>	24.75±4.16	23.84±4.64	24.44±4.34
25ВД ниво <sup>d</sup> (nmol/L)	64.78±23.22	50.32±20.81	59.89±23.42

<sup>a</sup> БТ – бъбречна трансплантация, <sup>b</sup> иГФ – изчислена гломерулна филтрация (формула СКD-EPI), <sup>c</sup> ИТМ – индекс телесна маса, <sup>d</sup> 25ВД – общ 25 хидроксивитамин Д

В тази група пациенти е налице висока честота на ВД недостатъчност – над 80%. Отново пациентите с ВД достатъчност са предимно мъже (43/52), а тежките форми на ВД дефицит се срещат по-често при жени (фигура 16)

Фиг. 16. Честота на ВД недостатъчност 12 месеца след БТ, n=275.



Проведе се регресионен анализ на групата, като се доказаха следните значими фактори, влияещи на ВД статуса поне 12 месеца след БТ (табл. 19).

Табл.19. Значими фактори за 25ВД (над 12 месеца от БТ), n=275.

	$\beta$	Std. Error	p
Свободна константа $\alpha$	5.406	0.466	<0.001
Женски пол	-0.349	0.052	<0.001
Захарен диабет	-0.200	0.081	0.014
Юли	0.274	0.099	0.006
Август	0.419	0.084	<0.001
Септември	0.320	0.079	<0.001
ln ИТМ	-0.704	0.337	0.038

ln ИТМ – естествен логаритъм от ИТМ

От данните в таблицата се отчита отново най-голямо влияние върху 25 ВД на ИТМ и женски пол. Всички посочени фактори (с изключение на сезонността) имат негативен ефект върху 25ВД. Важно е да се отбележи, че приемът на ЦСА и Так не са сигнификантни фактори за ВД статуса в тази група болни.

### 6.3.3.Резултати от регресионен анализ: давност на БТ над 36 месеца

Бяха селектирани 223 болни. Отново преобладаваха мъжете (М 148, Ж 75). Отново се установиха сходни стойности за средна възраст, давност на БТ и бъбречна функция между двата пола (стойности на р съответно 0.762, 0.349, 0.946). Отчете се статистически значимо по - висок ИТМ

при мъже ( $p= 0.045$ ) и значимо по-ниски стойности на 25ВД при жените ( $p<0.001$ ), като тези данни се сходни с получените при предходните групи болни (вж табл. 20).

Табл. 20. Базови данни за пациентите с БТ над 36 месеца,  $n=223$ .

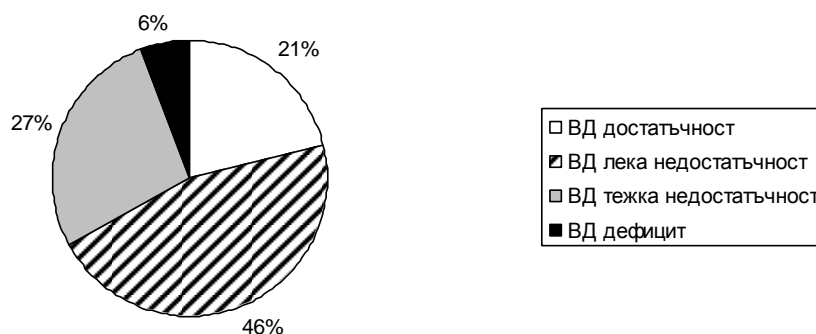
	Мъже	Жени	Общо
	148	75	223
Възраст (години)	43.80±13.05	43.27±11.32	43.62±12.47

Време след БТ <sup>a</sup> (месеци)	113.13±54.49	120.36±54.17	115.56±54.37
иГФ <sup>b</sup> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	62.49±21.88	62.72±26.83	62.57±23.60
ИТМ <sup>c</sup>	25.09±4.29	23.82±4.68	24.63±4.46
25ВД ниво <sup>d</sup> (nmol/L)	65.90±24.14	51.81±20.92	61.17±24.00

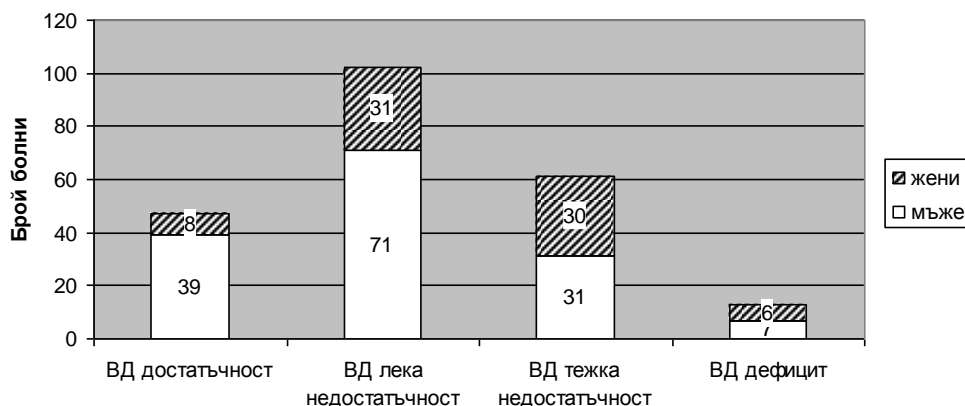
<sup>a</sup> БТ – бъбречна трансплантация, <sup>b</sup> иГФ – изчислена гломерулна филтрация (формула СКД-ЕРІ), <sup>c</sup> ИТМ – индекс телесна маса, <sup>d</sup> 25ВД – общ 25 хидроксивитамин Д

По отношение на ВД статуса не се откриват значими промени. Налице е леко покачване в процента на ВД достатъчност в тази група, но различните форми на ВД недостатъчност се срещат в малко под 80% от болните – фиг. 17. Отново се отчитат по-изразени отклонения в нивото на 25ВД при жени, и значително по-често срещана ВД достатъчност при мъже – фигура 18.

Фигура 17. ВД статус след 36-и месец от БТ, n=223.



Фигура 18. Разпределение по пол на отклоненията във ВД статуса след 36-и месец от БТ, n=223.



Резултатите от многофакторният регресионен анализ потвърдиха положителното влияние на сезонният фактор върху 25ВД (взимане на кръв през юли, август, септември), като стойностите на  $p$  бяха под 0.01, с изключение на пробовзимане през месец юли ( $p=0.025$ ). Налице е силна обратна връзка между 25 ВД и женски пол и ИТМ ( $p<0.05$ ) – вж таблица 21

Таблица 21. Фактори влияещи на 25ВД 36 месеца след БТ,  $n=223$ .

	$\beta$	Std. Error	$p$
Свободна константа $\alpha$	5.772	0.549	<0.001
Женски пол	-0.339	0.061	<0.001
Юли	0.282	0.125	0.025
Август	0.411	0.092	<0.001
Септември	0.254	0.088	0.004
ln ИТМ	-0.997	0.394	0.012

За разлика от предходните анализи, ЗД беше несигнификантен предиктор на 25ВД нивото, въпреки че стойността на  $p$  беше близо до нивото на значимост ( $p=0.062$ ). Друг показател близо до нивото на значимост беше приемът на ЦсА ( $p=0.058$ ).

#### 6.3.4. Резултати от регресионен анализ: давност на БТ над 60 месеца

След подбор на болните с давност на БТ над 60 месеца останаха 196 пациента. Налице са същите базови характеристики – мъжете са близо два пъти повече от жените ( М 127, 64.80%; Ж 69, 35.2%). Резултатите за възраст на болните, давност на БТ, бъбречна функция са без статистическа разлика между двата пола (стойности за р съответно 0.363, 0.713, 0.548). При мъжете се установява статистически значимо по-висок ИТМ (р=0.047). 25ВД отново е с по-ниски стойности при жените, но тук се отчита по-голяма разлика в средните стойности между двата пола – при мъже средната стойност за 25 ВД е  $66.86 \pm 24.83 \text{ nmol/L}$ , докато при жени е  $50.96 \pm 21.35 \text{ nmol/L}$ ,  $p < 0.001$ . Резултатите за пациентите са представени в таблица 22.

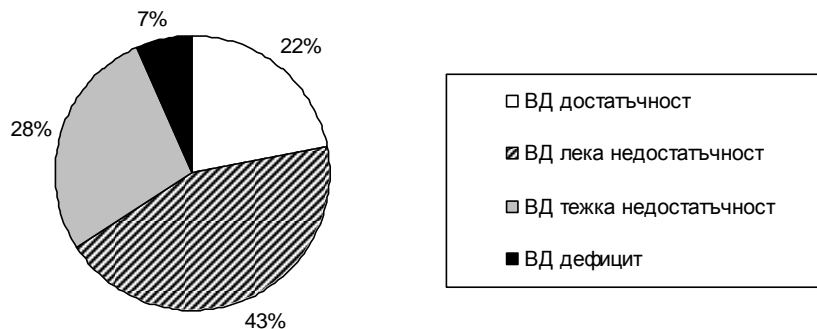
Табл. 22. Базови данни за пациентите с давност на БТ над 60 месеца.

	Мъже	Жени	Общо
	127	69	196
Възраст (години)	44.90 $\pm$ 12.89	43.28 $\pm$ 11.18	44.31 $\pm$ 12.31
Време след БТ <sup>a</sup> (месеци)	123.54 $\pm$ 51.84	126.41 $\pm$ 52.22	124.55 $\pm$ 51.86
иГФ <sup>b</sup> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	61.09 $\pm$ 22.17	63.26 $\pm$ 27.40	61.85 $\pm$ 24.09
ИТМ <sup>c</sup>	25.18 $\pm$ 4.25	23.86 $\pm$ 4.72	24.72 $\pm$ 4.46
25ВД ниво <sup>d</sup> (nmol/L)	66.86 $\pm$ 24.83	50.96 $\pm$ 21.35	61.85 $\pm$ 24.09

<sup>a</sup> БТ – бъбречна трансплантация, <sup>b</sup> иГФ – изчислена гломерулна филтрация (формула СКД-ЕРІ), <sup>c</sup> ИТМ – индекс телесна маса, <sup>d</sup> 25ВД – общ 25 хидроксивитамин Д

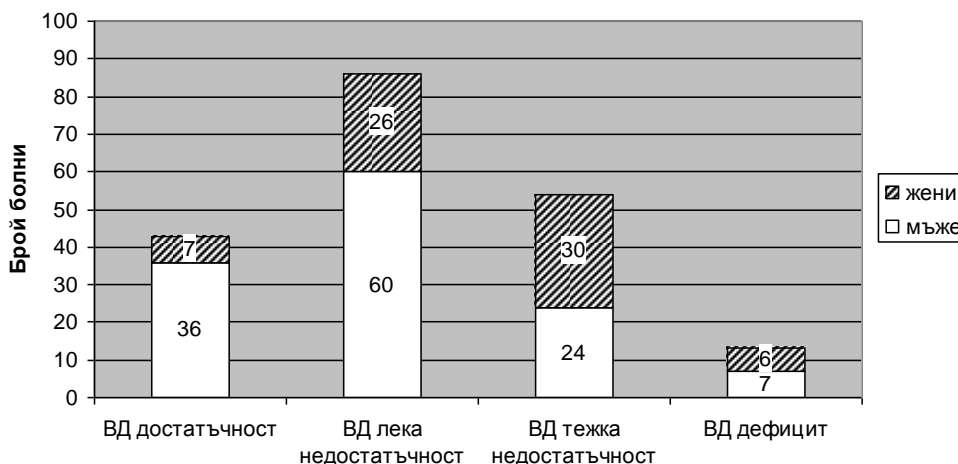
И в тази група от болни се доказва ниско ниво на ВД достатъчност (22%), което е малко по-висок процент от предходните групи. Отчита се високо ниво на ВД недостатъчност, като преобладава леката ВД недостатъчност (n=86), както и сходно ниво на ВД дефицит (7%) - фигура 19.

Фиг. 19. ВД статус при давност на БТ над 60 месеца, n=196.



По-тежките патологични отклонения във ВД статуса се доказват при жени, а ВД достатъчност е преобладаващо при мъже (М 36, Ж 7). За ВД дефицит броя на мъжете и жените е почти равен (М7, Ж6) – фигура 20.

Фиг.20. ВД статус по пол при БТ над 60 месеца, n=196.



След определяне на базовите данни на групата и нейният ВД статус се проведе регресионен анализ с цел установяване на значимите предиктори на 25ВД. Негативен ефект върху 25ВД се доказва при болни от женски пол, по-висок ИТМ, прием на ЦсА; положителна връзка се установи със сезонният фактор (взимане на кръв през Юли, Август, Септември) – вж. таблица 23.

Таблица 23. Значими предиктори на 25ВД при давност на БТ >60 месеца.

	$\beta$	Std. Error	p
Свободна константа $\alpha$	6.296	0.599	<0.001
Женски пол	-0.363	0.065	<0.001
Прием на ЦсА	-0.158	0.068	0.021
Юли	0.272	0.133	0.042
Август	0.421	0.096	<0.001
Септември	0.245	0.093	0.009
ln ИТМ	-1.279	0.434	0.004

Запазва се тенденцията за леко намаляване значимостта на сезонността, най-вече при взимане на кръв през м. Юли, което се отчете и при групата с давност над 6, 12 и 36 месеца (табл. 17, 19, 21).

### 6.3.5. Резултати от регресионен анализ: БТ с давност над 120 месеца

В тази глава се разглеждат факторите, влияещи на ВД статуса при пациенти с давност на БТ над 10 години. Общият брой на болните е 89, като отново преобладават тези от мъжки пол (n=57). При мъжете се установява по-висока средна възраст спрямо жените, без това да е статистически значимо (p=0.122). Сходни са резултатите относно ИТМ и продължителност на БТ при мъже и жени (p=0.124 за ИТМ и p=0.775 за продължителност на БТ). Забелязва се по-ниска стойност на иГФ при жени, но отново е налице статистически незначима разлика (p=0.50). Базовите данни са представени в таблицата по-долу.

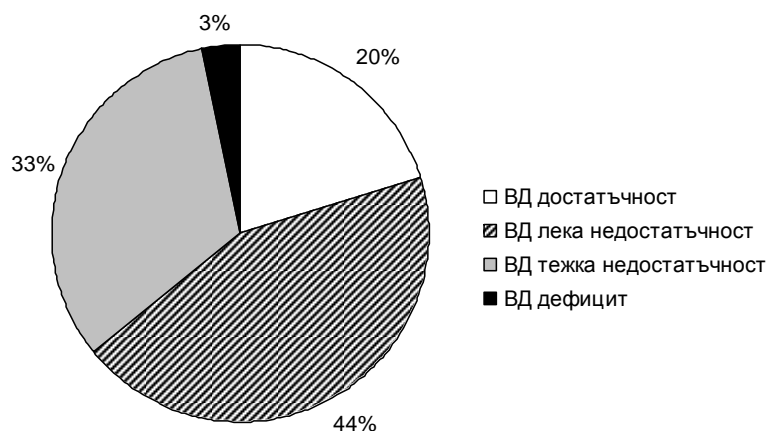
Таблица 24. Базови данни за пациентите с БТ, давност над 120 месеца, n=89

	Мъже 57	Жени 32	Общо 89
Възраст (години)	48.84±12.64	44.78±9.98	47.38±11.86
Време след БТ <sup>a</sup>	172.23±37.03	174.50±33.87	173.04±35.76

(месеци)			
иГФ <sup>b</sup> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	63.40±22.14	59.72±28.58	62.08±24.55
ИТМ <sup>c</sup>	24.70±3.31	23.30±5.21	24.20±4.12
25ВД ниво <sup>d</sup> (nmol/L)	65.93±23.14	50.78±23.24	60.49±24.18

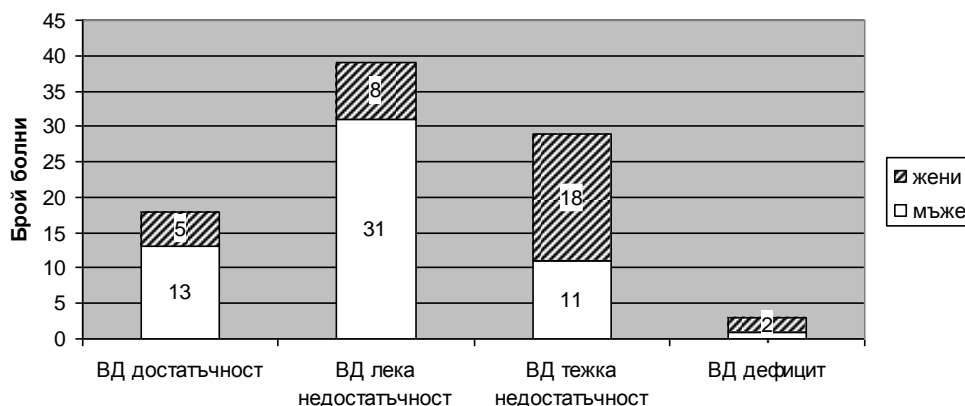
При оценка на ВД статуса се отчита по-нисък процент на ВД недостатъчност (3%) спрямо разглежданите досега групи. Останалите показатели са със сходни показатели, като отново се отчита лека ВД недостатъчност като най-честото нарушение – 39 от всички болни.(фиг. 21)

Фиг. 21 ВД статус при БТ с давност над 120 месеца, n=89



Запазва се тенденцията по леките нарушения на ВД статуса, както и ВД достатъчност да е налице при мъже, докато тежка ВД недостатъчност и ВД дефицит да е по-характерен при жени – фиг.22.

Фиг. 22. ВД статус по пол при БТ над 120 месеца



Многофакторният регресионен анализ показва значимо повлияване на 25ВД от женски пол и ИТМ (негативна връзка), и очакваният положителен ефект на сезонността - тестване за 25 през м. Август (табл. 22). Отчита се намаляване на ефекта на пробовзимането през месеците юли и септември до незначими стойности, което като цяло затвърждава тенденцията за отслабване на ефекта на сезонността при пациентите с по-голяма давност на БТ. Затвърждава се значимостта на пола и ИТМ в различните периоди след БТ. Табл.25. Значими фактори за ВД статуса при БТ с давност над 120 мес.

	$\beta$	Std. Error	p
Свободна константа $\alpha$	6.645	0.788	<0.001
Женски пол	-0.445	0.082	<0.001
Август	0.323	0.122	0.010
ln ИТМ	-1.566	0.573	0.008

### 6.3.6. Заключение

Наблюденията в посочените по-горе групи пациенти с БТ може да се обобщят в следните изводи:

1. Във всички разглеждани групи пациентите от мъжки пол преобладават, като отношението М:Ж е приблизително 2:1.
2. Средната възраст на пациентите варира в рамките на 42 – 45 години (вж. приложените таблици), като тези стойности са сходни при различните групи болни според давността на БТ. Аналогично сходни стойности се установяват бъбречна функция (иГФ 59 – 65мл/мин/1,73м<sup>2</sup>) като средни стойности за отделните групи.
3. В базовите данни – възраст, давност на БТ и бъбречна функция не се установяват статистически значими различия в отделните разглеждани групи.
4. В групата след 6-и месец, след 36-и месец и 60-и месец след БТ е налице статистически по-висок ИТМ при мъже (за съответните популации  $p=0.037$ ,  $p=0.0045$ ,  $p=0.047$ ).
5. Налице е статистически значимо по-ниско серумно ниво на 25ВД при жени във всички изследвани групи, въпреки по-ниският ИТМ при тях. По-детайлно този проблем ще бъде развит в следващите глави.
6. Във всички изследвани групи се установява висока честота на ВД недостатъчност. ВД достатъчност се отчита в рамките на 18 – 20% и нейната честота е стабилна в описаните групи. Най-често срещаното отклонение е леката ВД недостатъчност. Най-тежкото отклонение – ВД дефицит се доказва в честота 6 -7 % от болните, но в групата на болни с БТ над 120 месеца ВД дефицита е най – нисък (3%).
7. При болните от женски пол се установяват по-често по-тежките отклонения във ВД статуса (тежка ВД недостатъчност и ВД дефицит), при мъжете по-често се установява ВД достатъчност.
8. Установиха се редица фактори, влияещи на 25ВД. Повечето от тях имат обратна връзка с нивото на 25ВД, като единствено сезонността е със значима положителна асоциация. При пациентите с по-голяма давност на БТ настъпва промяна във факторите.
9. Негативният ефект на Так не се отчита при давност на БТ над 12 месеца. Ефектът на ЦсА се отчита освен след 6-и месец и след 60-и месец от БТ. Не се отчита сигнификантно влияние при болните с давност на БТ над 120 мес.

10. Негативното влияние на ЗД се отчита в групите бъбречнотрансплантирани след 6-и и 12-и месец от БТ. След 36-и месец и с по-голяма давност не се отчита значим ефект.
11. Сезонността е фактор, който се открива във всички изследвани групи. Трябва да се отбележи, че е налице неговата значимост постепенно да намалява при разглеждане на групите с по-голяма давност на БТ.
12. Женският пол неизменно е значим фактор, имащ негативен ефект върху серумното ниво на 25ВД. Във всички изследвани групи се отчита силно изразена значимост ( $p < 0.001$ )
13. Телесната маса (представена като естествен логаритъм на ИТМ) е статистически значим фактор, свързан с по-ниски нива на 25ВД. Това се установява във всички групи болни, с високо ниво на значимост (в повечето случаи  $p < 0.01$ ).

Промените във факторите, влияещи на 25ВД са схематично дадени по-долу (табл. 26)

Таблица 26. Фактори, влияещи на 25ВД при различните групи болни според давността на БТ

Фактор	След 6 <sup>и</sup> месец	След 12 <sup>и</sup> месец	След 36 <sup>и</sup> месец	След 60 <sup>и</sup> месец	След 120 <sup>и</sup> месец
Жени	X	X	X	X	X
Юли	X	X	X	X	
Август	X	X	X	X	X
Септември	X	X	X	X	
Захарен диабет	X	X			
ln ИТМ	X	X	X	X	X
Циклоспорин А	X			X	
Такролимус	X				

X – наличие на статистически значим ефект на обозначения фактор в съответната група болни.

## 6.4. Влияние на пола върху 25ВД при БТ

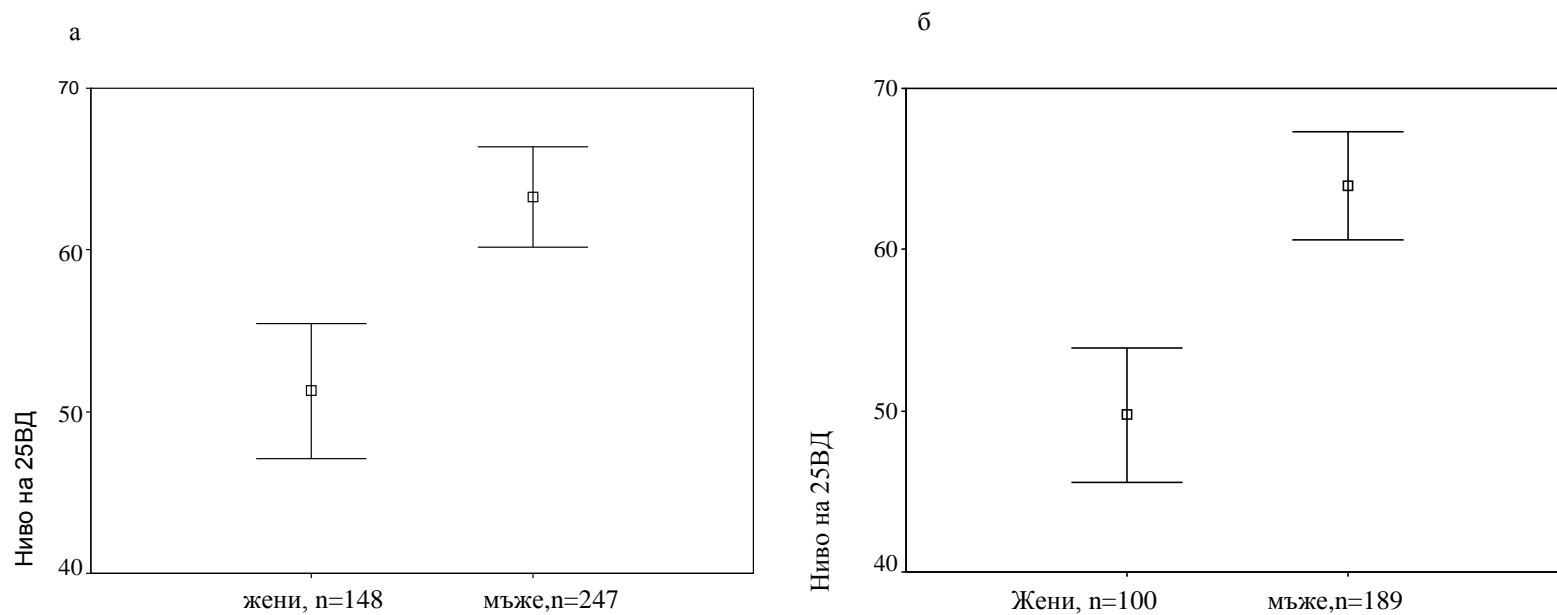
### 6.4.1. Резултати

В описаните резултати по-горе женският пол се свързва със значимо по-ниски нива на 25ВД в групите с различна давност на БТ. Значима разбика в 25ВД се отчита още в общата популация (n=395) – при мъже средното ниво на 25ВД е  $63.28 \pm 24.53$  nmol/L, при жени -  $51.27 \pm 25.69$ ,  $p < 0.001$ . Сходни са резултатите при селектираните групи, с различна давност на БТ (таблица 27, фиг. 23 а, б, в, г, д, е).

Табл. 27. Средни стойности на 25ВД при мъже и жени, статистическа значимост при различни групи болни според давност на БТ.

Група	Средна стойност (М)	Средна стойност (Ж)	Т-тест независими променливи Р	Тест на Levine Р
Обща група, n=395	63.28±24.53	51.27±25.69	<0.001	0.907
Давност над 6 месеца, n=289	63.97±23.31	49.73±21.02	<0.001	0.637
Давност над 12 месеца, n=275	64.78±23.22	50.32±20.81	<0.001	0.560
Давност над 36 месеца, n=223	65.90±24.14	51.81±20.92	<0.001	0.317
Давност над 60 месеца, n=196	66.86±24.83	50.96±21.35	<0.001	0.284
Давност над 120 месеца, n=89	65.93±23.14	50.78±23.24	0.004	0.464

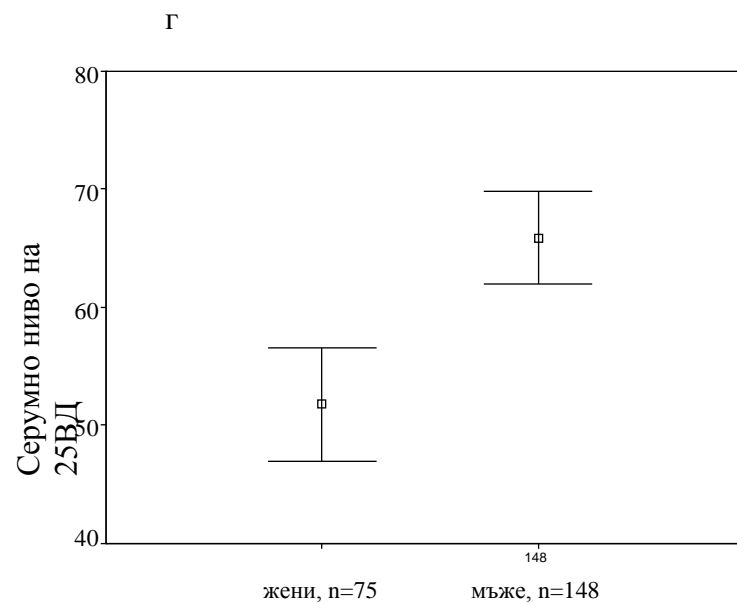
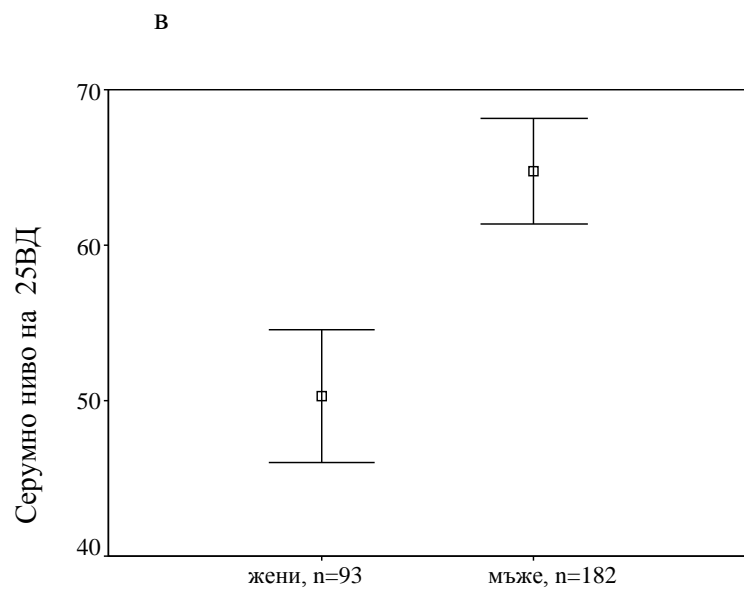
Фигура 23. Нива на 25ВД при мъже и жени в общата популация и селектирани пациенти, с различна давност на БТ, 95% интервал на доверителност.



23а. Разлика в средните нива на 25ВД при жени и мъже в общатата група

23б. Разлика в средните нива на 25ВД при жени и мъже, БТ >6 мес.

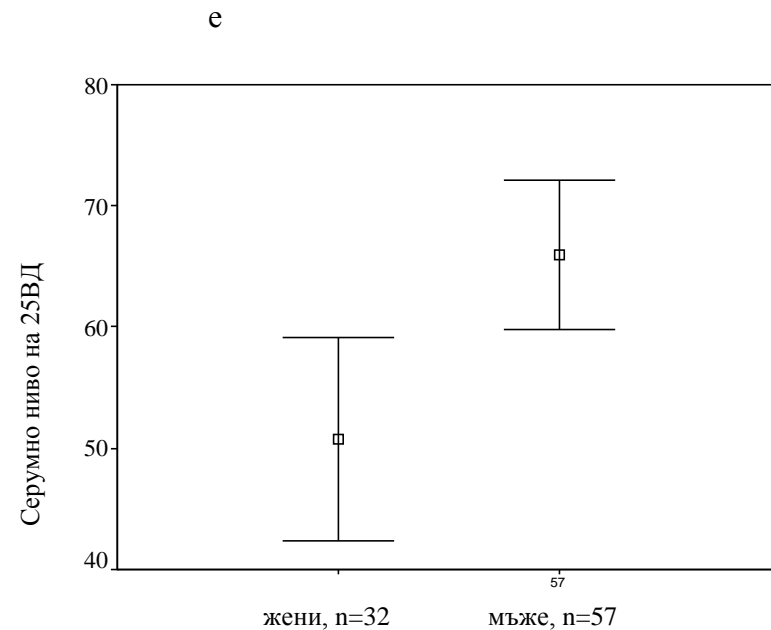
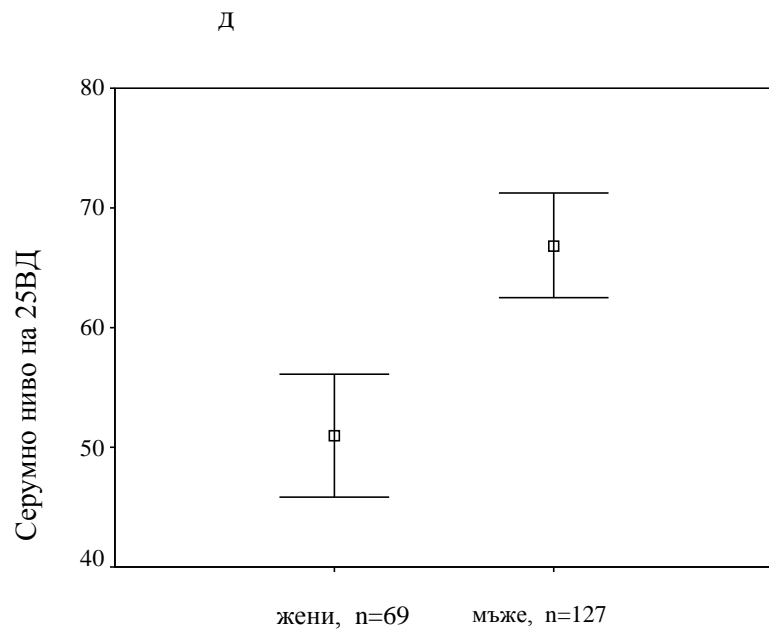
Фигура 23 – продължение



23в. Разлика в средните нива на 25ВД при жени и мъже, БТ>12месеца.

23г. Разлика в средните нива на 25ВД при жени и мъже, БТ>36месеца.

Фигура 23 – продължение



23д. Разлика в средните нива на 25ВД при жени и мъже, БТ>60месеца  
23е. Разлика в средните нива на 25ВД при жени и мъже, БТ>120месеца.

За проверка валидността на теста с независими променливи паралелно се проведе и тест на Levine за хомогенност на вариацията. Стойностите на  $p > 0.05$ , които са посочени в табл. 27 потвърждават това твърдение, което валидизира използваният статистически метод.

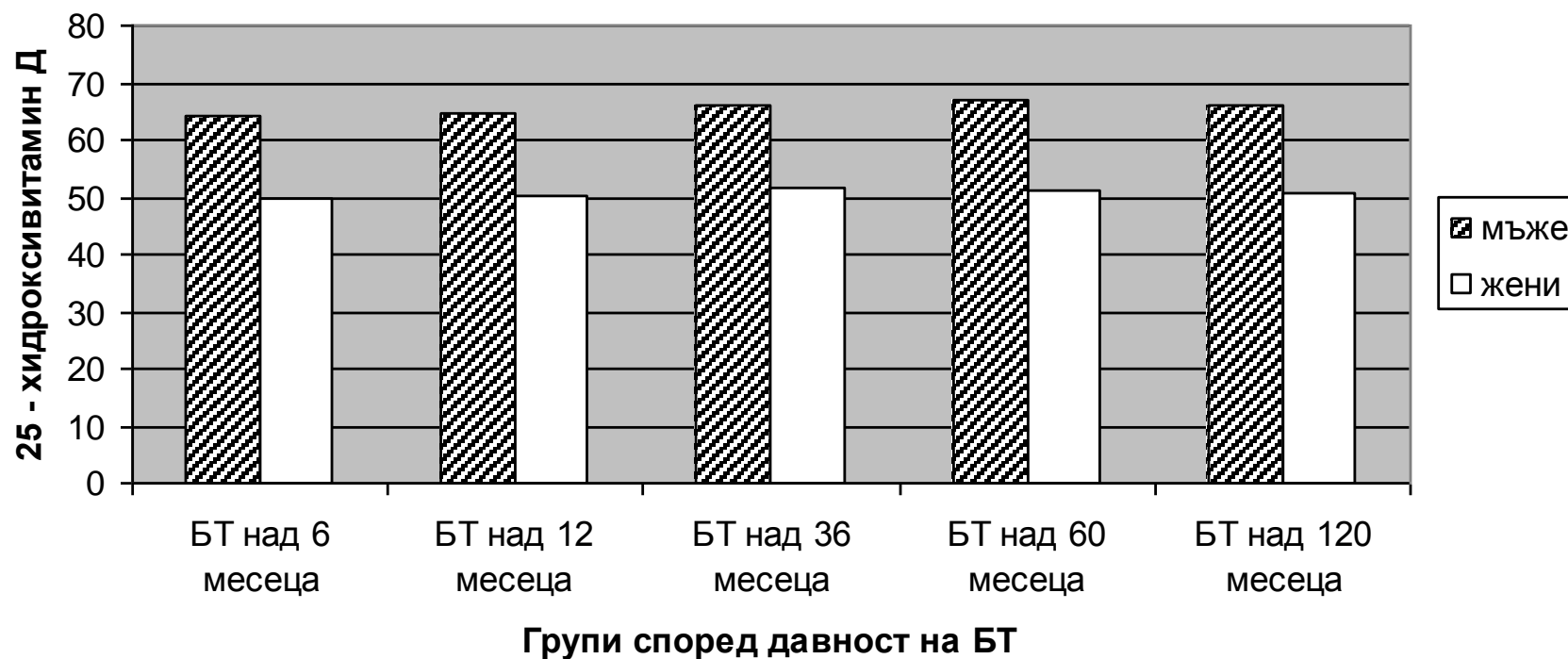
Разликата между нивото на 25ВД при мъже и жени в съответните селектирани групи според давността на БТ варира между 14 и 16 nmol/L, като е по-голяма в групите с давност над 60 месеца (15.09 nmol/L) и над 120 месеца (15.90 nmol/L), без да достига значителна разлика между групите. Динамиката в междуполовите разлики е представена в графика 4.

#### **6.4.2. Заключение**

По-горните наблюдения, както и резултатите от регресионният анализ дават основание за следните заключения:

1. Женският пол е статистически значим и независим фактор, асоцииран с по-ниски нива на 25ВД
2. В различните групи пациенти според давността на БТ женският пол е значим фактор на фона на статистически незначими междуполови различия по отношение на възраст, давност на БТ, бъбречна функция
3. В три от групите – с давност на БТ над 6, 36 и 60 месеца се установи значимо по-нисък ИТМ при жени. 25ВД остава значимо по-нисък при жени, въпреки негативният ефект на ИТМ върху ВД статуса.
4. Различията в 25ВД нивото между мъже и жени се запазват сравнително стабилни в различните групи разгледани бъбречнотрансплантирани. Налице е лека тенденция към увеличение на разликата при БТ с по голяма давност - под 15 nmol/L за давност над 6, 312 и 36 месеца, над 15 nmol/L (давност над 60 и 120 месеца)

Графика 4. Динамика в междуполови различия в 25ВД според давността на БТ.



## **6.5. Влияние на сезонността върху ВД статуса при пациенти след БТ**

### **6.5.1. Селекция на пациентите и резултати**

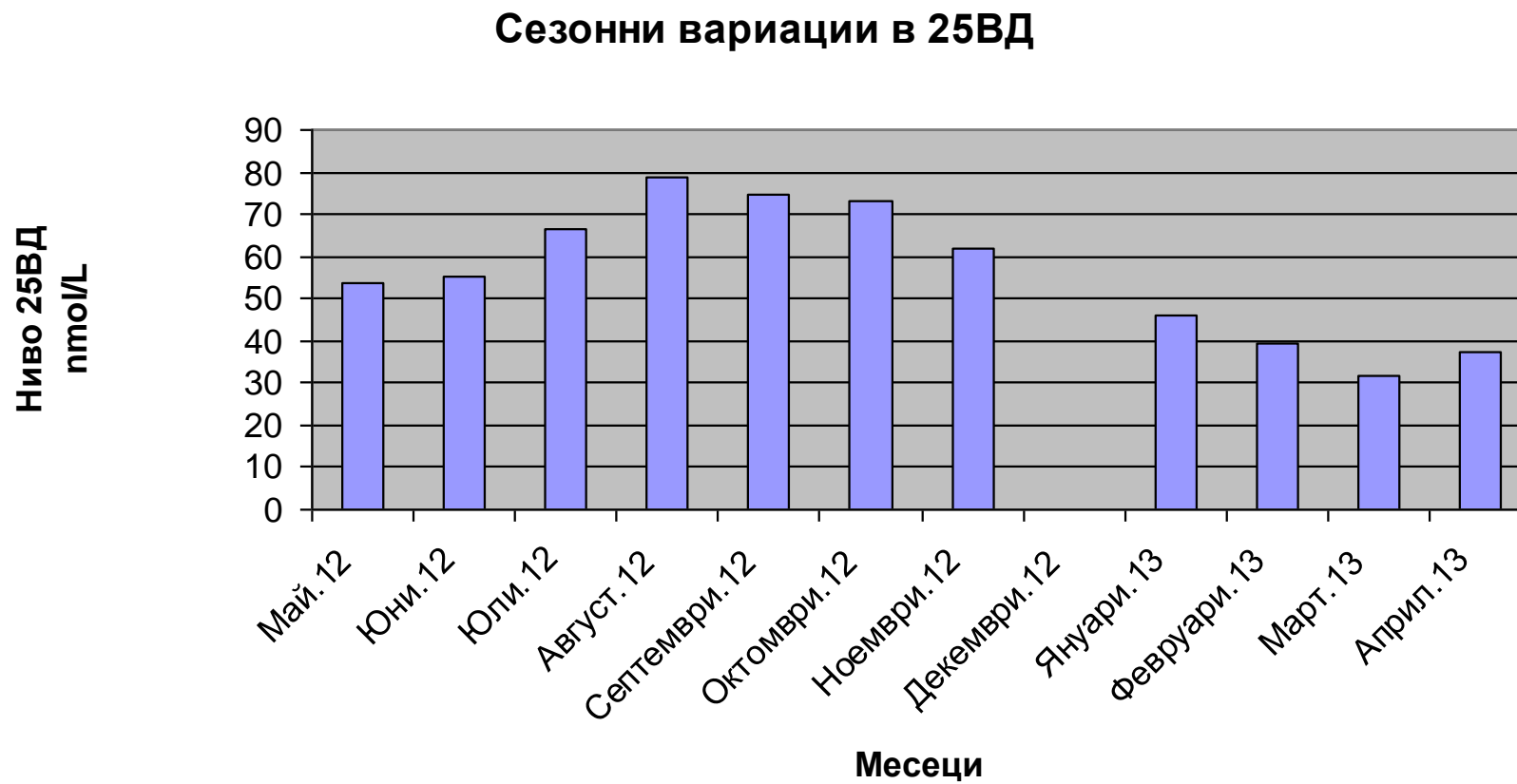
Болните бяха селектирани от общата група пациенти с БТ (n=395) по критериите от глава 5.1.1. При проследяването на надира в серумното ниво на 25ВД бяха въведени допълнителни критерии за подбор:

1. Селектираха се болни тествани за 25 ВД в периода 1 януари 2013 – 30 април 2013год.
2. Пациенти с промяна в имуносупресивната терапия не бяха включени в проучването
3. Изключени бяха пациенти с промяна (влошаване) на бъбречната функция
4. Изключени бяха болните с промяна във ВД суплементацията (добавен или прекъснат медикамент).

По този начин бяха селектирани 232 болни, мъже 153, жени 79. Които са тествани двукратно за 25ВД – първоначално в периода май – ноември 2012, след което януари – април 2013. За статистическа оценка в разликата на 25 ВД в двете изследвания се използва вариантът на Т- тест за чифтни данни ( paired samples T-test).

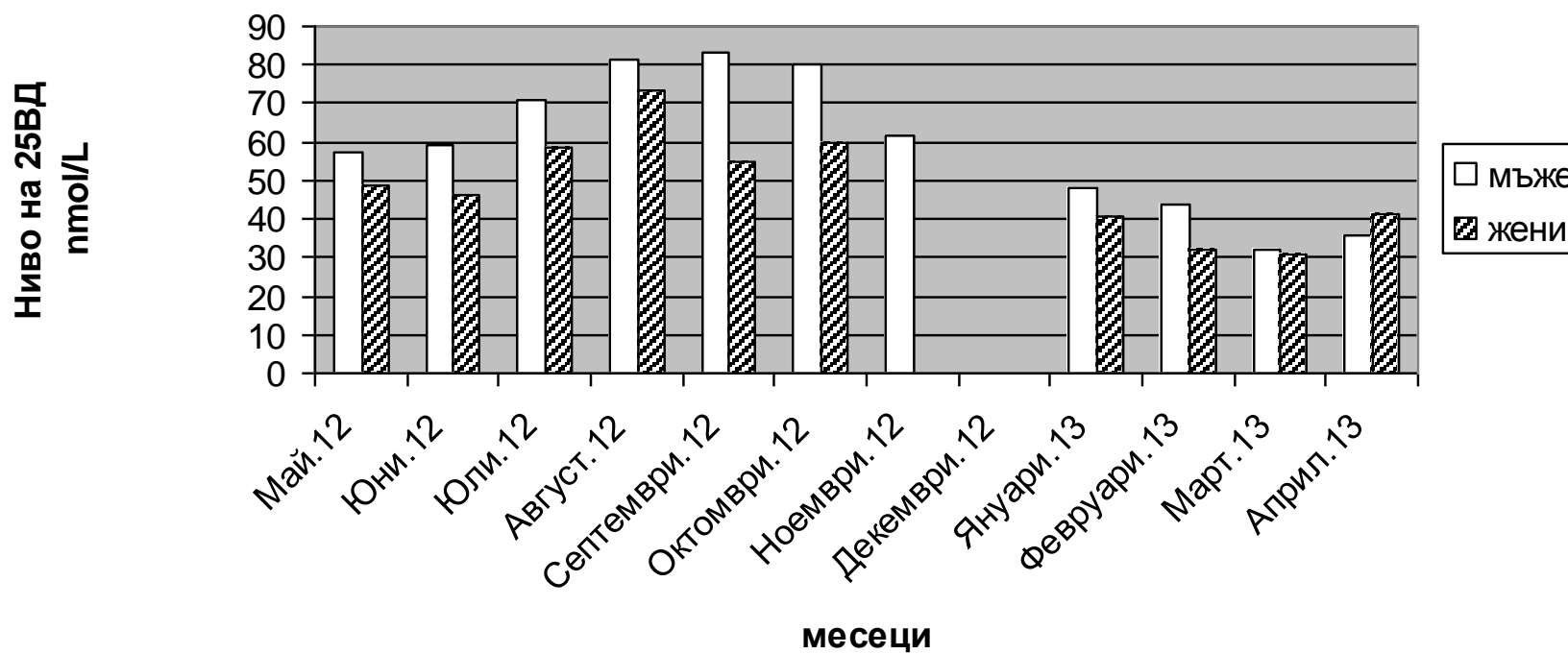
Нашите данни показаха значително по-ниски нива за 25ВД в периода януари – април 2013 год, което съвпада с очакваният надир на 25ВД поради намалената експозиция на слънчева светлина през зимата. Най-нисък 25ВД е отчетен през месец Март – средно ниво 32.22nmol/L. Най-висок 25ВД се отчита през август – 78.83nmol/L , като високи стойности се отчитат през като цяло летните месеци (Август, Септември) и октомври – средни стойности над 70nmol/L за този период на годината (вж графика 5). Въпросните зависимости се запазват и между двата пола – графика 6.

Графика 5.



Графика 6.

### Сезонни вариации по пол на 25ВД



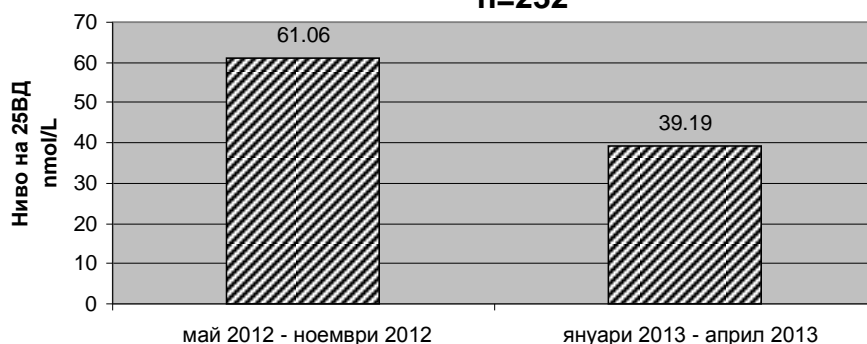
От двете групи болни (тествани през май-ноември и тествани януари – април) пациентите са селектирани така, че да имат сходни показатели по отношение на имуносупресивна терапия, бъбречна функция, ВД суплементация. Болните са със сходна честота на всички показатели, изолирани като влияещи на 25ВД от регресионния анализ, като липсваше информация само за разликата в ИТМ между двете групи. Проведе се описаният статистически тест за оценка на ВД в двата периода, като едновременно се провери и разликата в ИТМ в двете групи. Резултатите са приложени в таблицата 28 и графика 7.

Таблица 28. Разлика в средни нива на 25ВД и ИТМ в двете групи болни, n=232.

Показател	Май 2012 – Ноември 2012		Януари 2013 – Април 2013		p
	Средна стойност	SE	Средна стойност	SE	
	25ВД	61.06±22.31	1.46	39.19±18.89	
ИТМ	24.40±4.37	0.29	24.42±4.58	0.30	0.836

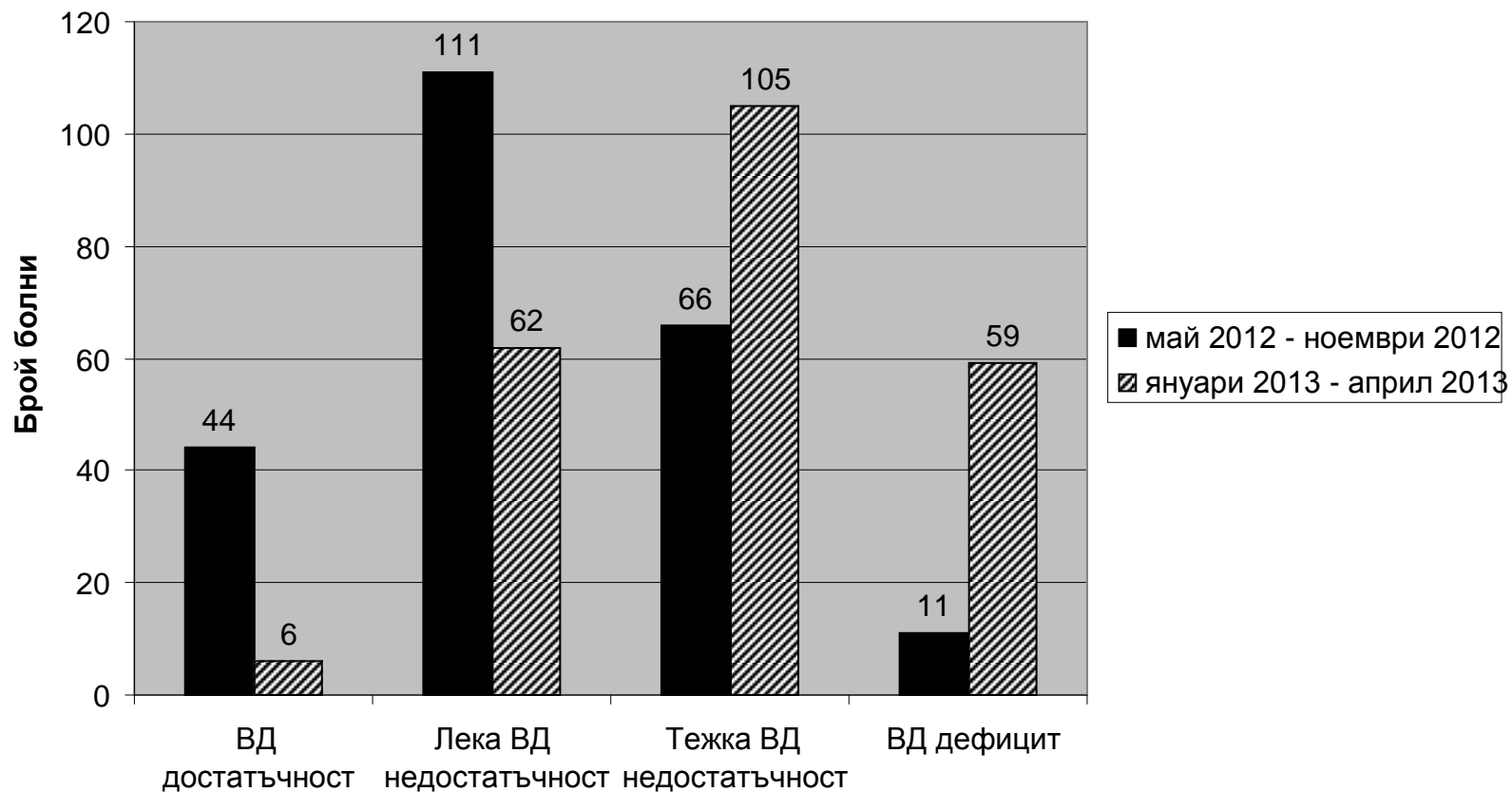
SE – стандартна грешка, ИТМ – индекс телесна маса

**Графика 7. Разлика в средните сезонни нива при пациентите, n=232**



По-долу са представени промените във ВД статуса при пациентите в двата изследвани периода (графика 8). Налице е изразено влошаване на

Графика 8. Сезонна промяна във ВД статуса, n=232

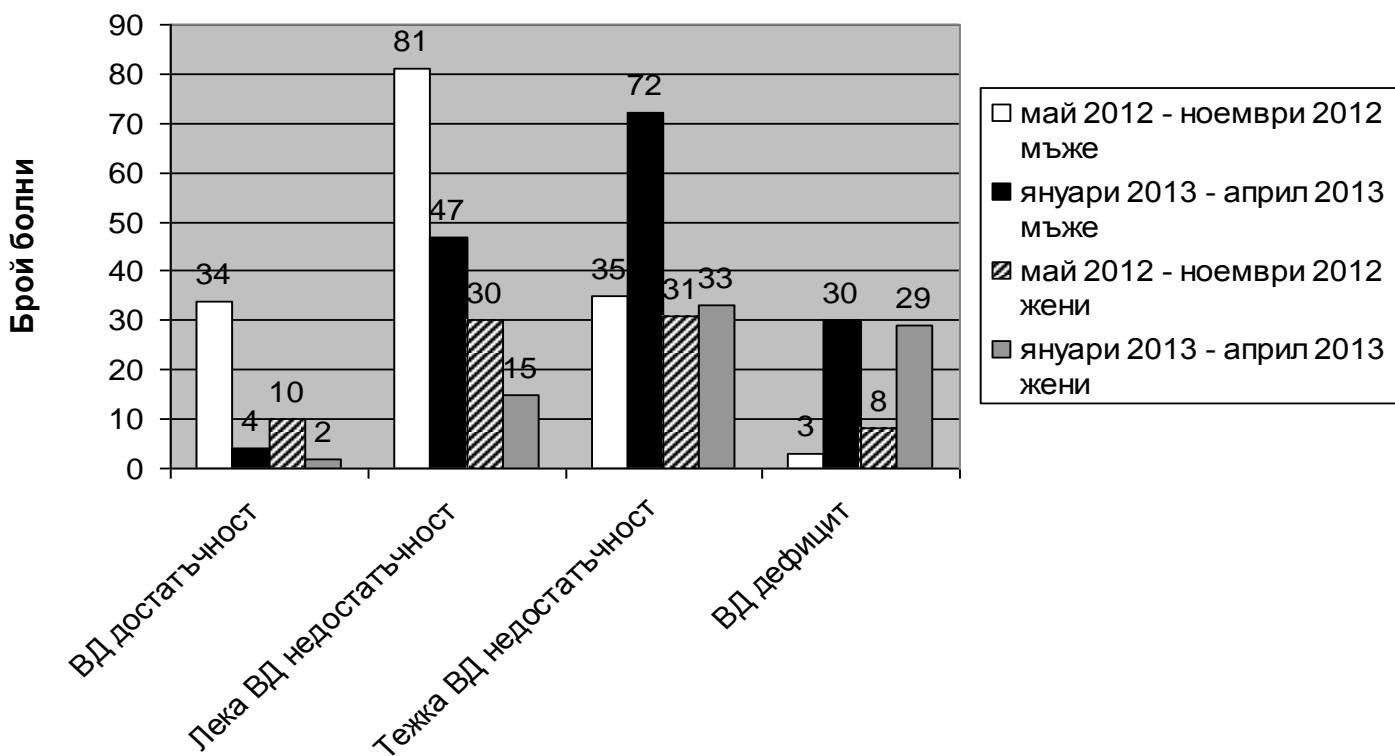


на ВД статуса при пациентите през януари – април 2013 спрямо май - ноември 2012 год. Отчита се силно намаляване в броя на пациентите с ВД достатъчност (само 6 болни, 2.59%) и рязко покачване на пациентите с ВД дефицит. Отчита се като цяло значително покачване в броя на пациентите с по-тежко отклонение на ВД статуса (тежка ВД недостатъчност и ВД дефицит).

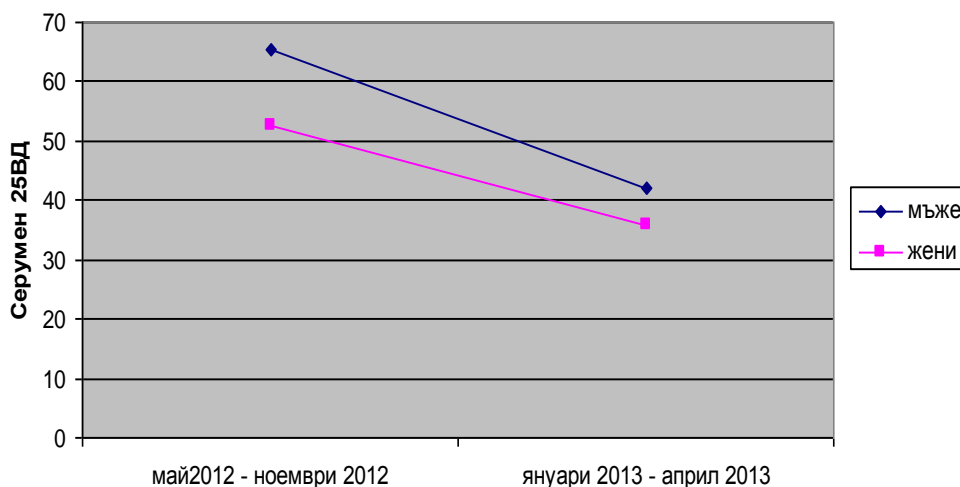
По отношение на промените във ВД статуса при отледните полове, влошаването се отчита и при двата пола. Промените обаче са по-изразени при мъжете. През януари – април 2013 се мъжете преобладават във всички състояния на ВД статуса, за разлика от май – ноември 2012, когато мъжете значително преобладават само в групите с достатъчност и лека недостатъчност. При пациентите от женски пол е налице влошаване на показателите, но то е по-слабо изразено, от колкото мъжете – мъжете с ВД дефицит нарастват 10 пъти през януари-април 2013, докато броят на жените със сходно отклонение се покачва малко над 3 пъти. Почти не се установява разлика в броя на жените с тежка ВД недостатъчност в двата периода, докато при мъжете е налице увеличение над 2 пъти. Схематично и детайлно тези данни са представени в графика 9. Средните стойности на 25ВД за съответните периоди също показват по-изразен спад при мъжете.

Средната стойност на 25ВД за май-ноември при мъже е  $65.52 \pm 21.75 \text{ nmol/L}$ , за януари – април -  $41.97 \pm 18.06 \text{ nmol/L}$ . При жени стойностите на 25ВД за същите периоди са съответно  $52.44 \pm 20.91$  и  $35.68 \pm 19.87 \text{ nmol/L}$ . Очертава се тенденция към приближаване на средните нива на 25 ВД при мъже и жени през зимно-пролетните месеци ( графика 10)

Графика 9. Промени във ВД статуса при мъже и жени.



Графика 10. Промени в средните нива на 25ВД при мъже и жени.



### 6.5.2. Фактори, влияещи на сезонният спад на 25ВД при пациентите с БТ

С оглед на установените изразени промени във 25ВД при разгледаната група болни в двата периода за сравнение, решихме да установим факторите, които влияят на сезонният спад. За тази цел бяха селектирани само болните с намаляване на 25ВД от май-ноември 2012 до януари - април 2013 год.

Селектираха се 206 болни. При тях се оцени разликата между нивото на 25 ВД през първи период (май - ноември 2012) и втори тест за 25ВД (януари – април 2013). За установяване на предикторите за сезонен спад отново се използва многофакторен регресионен анализ, като се използва същият набор от описаните вече вероятни фактори. Резултатите от регресионният анализ да обобщени във таблица 29.

Табл. 29. Фактори, влияещи на сезонният спад на 25ВД при пациенти с БТ, n=206.

	B	Std. Error	p
Свободна константа $\alpha$	63.877	17.271	<0.001
Мъжки пол	5.789	1.994	0.004
Юли	8.763	3.296	0.003
Август	22.187	3.012	<0.001
Септември	20.589	3.161	<0.001
Март	8.530	2.291	<0.001
Април	8.441	3.535	0.018
ln ИТМ	-37.194	12.497	0.003

С най-голямо значение за сезонна промяна в нивото на 25ВД е имат сезонните фактори (времето на тестване), което съвпада с всеизвестните наблюдения свързани с промените в слънчевото греене през лятото и зимата. Мъжкия пол е значим фактор влияещ на сезонният спад – при мъже се отчита по-изразено намаление на 25ВД. При пациентите с висок ИТМ се отчита по-слабо намаляване на 25ВД.

### 6.5.3. Заключение

Взимайки в предвид посочените по-горе наблюдения, може да се направят следните изводи за сезонните промени на 25ВД при пациентите с БТ:

1. Налице е изразено намаление на 25ВД в зимно-пролетните месеци от годината, което е в синхрон с общоприетите данни за концентрационният надир на 25ВД

2. Установи се силно намаляване на броя на пациентите с ВД достатъчност, като техният дял в общата популация спада под 3%, докато се установява покачване в дела на пациентите с тежки отклонения във ВД статуса (тежка недостатъчност и дефицит)
3. Описаните промени се установяват както в общата популация, така и разпределени по пол.
4. При мъжете се отчита по-тежка промяна във ВД статуса от периода май-ноември 2012 до периода януари – април 2013. В зимно-пролетният период настъпва изравняване и леко преобладаване в броя на пациентите от мъжки пол с тежка ВД недостатъчност и дефицит спрямо жените със същото ниво на отклонение
5. Сезонният спад на 25ВД при пациенти с БТ се влияе от няколко фактора. На първо място излизат сезонните фактори, като с по-голямо значение е тестването през летните месеци. На втори план се доказват наличието на мъжки пол, което е свързано със значимо по-голямо намаление на 25 ВД, както и висока ИТМ, която се свързва със статистически по-малко намаление.

## **6.6. Влияние на ИТМ върху ВД статуса при пациенти с БТ**

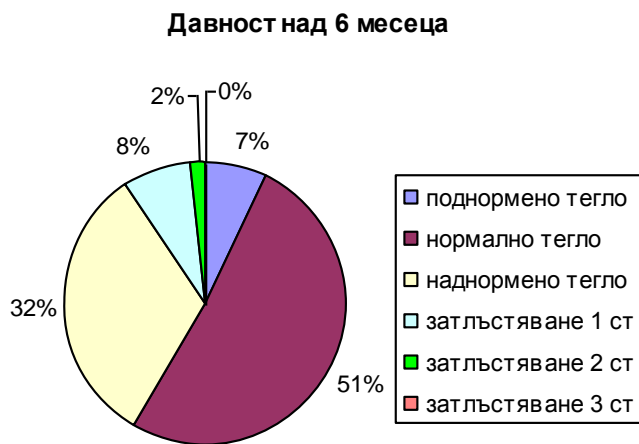
Описаното влияние на ИТМ върху 25ВД от многофакторният регресионен анализ наложи допълнително изследване на връзката ИТМ - ВД статус - БТ.

### **6.6.1.Разпределение на пациентите с различна давност на БТ според ИТМ**

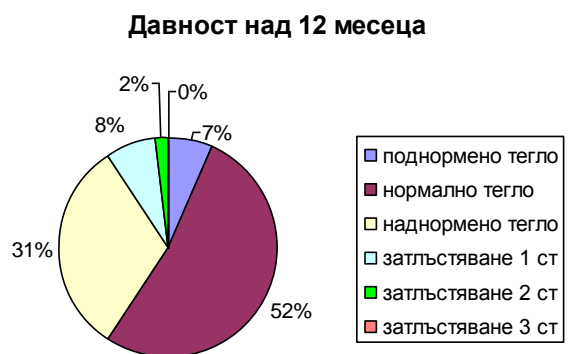
В петте групи болни според давност на БТ са налице редица сходни наблюдения. Във всички групи липсват пациенти със затлъстяване 3ст. Най-често срещаните форми на ИТМ са нормална телесна маса (варираща в рамките 51 - 53%, при БТ над 120 мес - 56%) и наднормено телесно тегло (31 - 33%). Затлъстяване 1 ст се установява в 8 - 9% от пациентите във всички групи, а затлъстяване 2 ст - 2%. Резултатите са обобщени във фигура 24 - а, б, в, г, д.

Фигура 24. Разпределение по ИТМ.

24а

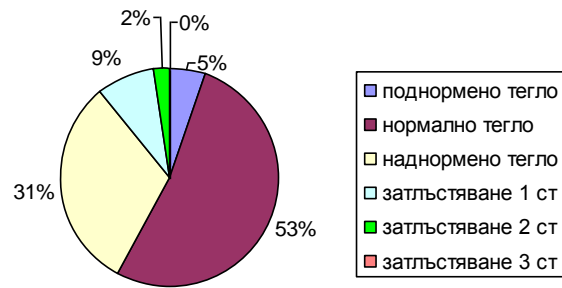


24б



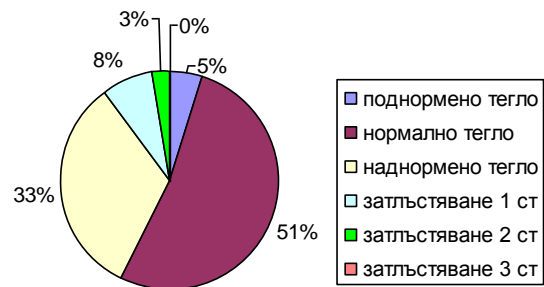
24в

### Давност над 36 месеца



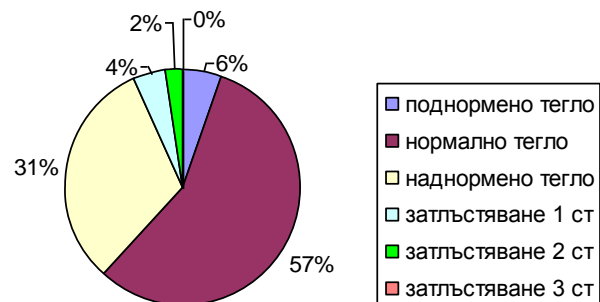
25г

### Давност над 60 месеца



24д

### Давност над 120 месеца



За да оценим в детайли връзката между ИТМ и нивото на 25ВД разгледахме пациентите с БТ разпределени по ВД статус, ИТМ, за съответните давности на БТ. Във всички групи по давност на БТ при пациентите с поднормено телесно тегло се установява най-висок процент на ВД достатъчност, който варира между 25 и 50% от пациентите с поднормено тегло. Налице са по-високи проценти на ВД достатъчност при ИТМ под 18.5 при давност над 36-месеца, над 60 месеца, над 120 месеца (ВД достатъчност над 40%). Най-нисък дял на ВД достатъчност се отчита при затлъстяване 1 ст, като при БТ над 120 месеца при болните със затлъстяване 1 и 2 степен не се отчитат пациенти с ВД достатъчност. В групите с нормална телесна маса и наднормено тегло, които са най-многобройни във всички разглеждани кохорти от пациенти, преобладават леката и тежката ВД недостатъчност. В тези степени на разпределение по ИТМ ВД достатъчност се среща в около 20%, а ВД дефицит – под 10%, което е по-малък процент от колкото ВД дефицита при пациентите с поднормена телесна маса (честота 10%, с изключение на групата с давност на БТ над 120 месеца – 0%). При пациентите със затлъстяване 1 степен се установяват най-високи нива на ВД дефицит (10-14%) най-ниско ниво на ВД достатъчност (от 11% в групата с БТ над 12 месеца до 0% при БТ над 120 месеца). Тук отново доминират леката и тежката недостатъчност на ВД. В най-малобройната група – болните със затлъстяване 2 ст не се установяват болни с ВД дефицит, преобладават болните ВД недостатъчност (лека и тежка), налице е ВД достатъчност около 20%, с изключение на болните с БТ над 120 месеца. Трябва да се отбележи обаче сравнително малкият брой на пациенти в тази група. Резултатите от разпределението по ВД статус, ИТМ и давност на БТ са представени във фигура 25.

Налице е тенденция за по-ниски средни нива на 25ВД при пациентите със затлъстяване 1 и 2 ст във всички групи с различна давност на БТ. Тази тенденция е позобразена при болните с по-продължителна БТ (над 120 месеца). При поднормено тегло и нормална телесна маса се отчитат най-високите средни нива на 25ВД, като за някои групи (давност над 6 и 12 месеца) 25ВД е по-високо при нормална телесна маса, докато при останалите групи – най-високи стойности се откриват при поднормено тегло. Описаните тенденции в средното ниво на 25ВД според ИТМ статус и продължителност на БТ са представени на графика 11.

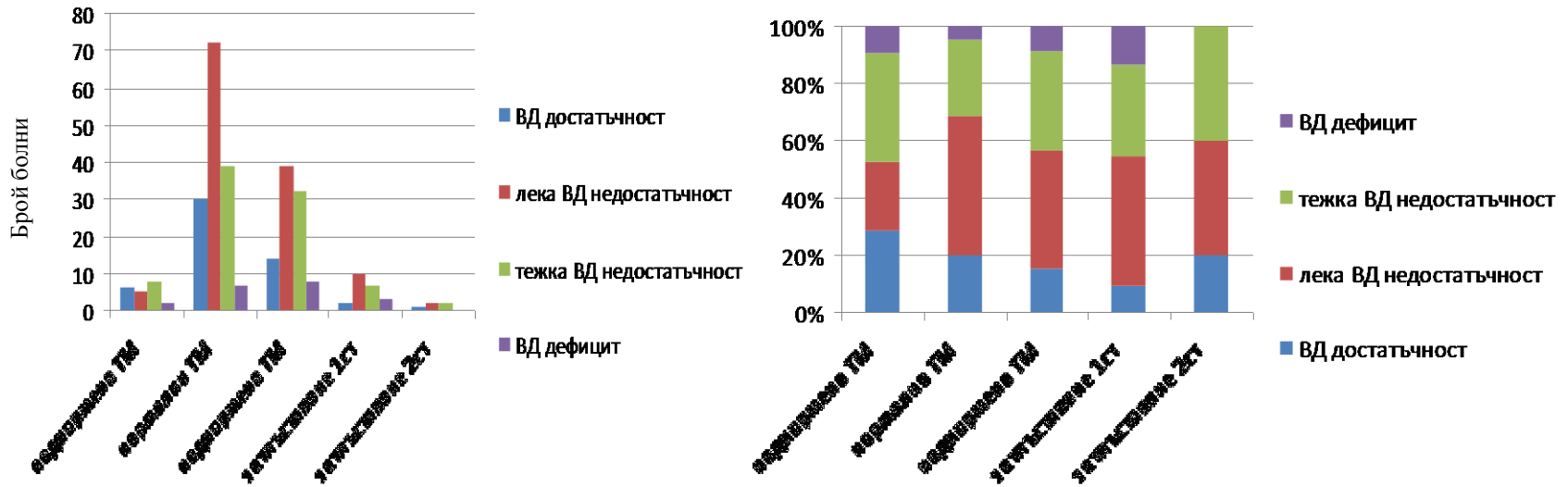
### 6.6.2. Заключение

С оглед на резултатите от регресионният анализ и описаните по-горе допълнителни проучвания можем да поставим следните заключения:

1. Най-честата находка по отношение на ИТМ е нормална телесна маса и наднормено тегло. Тази находка е налице във всички групи с различна давност на БТ.
2. Най-малък е дялът на пациентите със затлъстяване 2 ст. Няма пациенти със затлъстяване 3 ст.
3. При пациентите с поднормена телесна маса се отчита най-висок процент на ВД достатъчност. При болните над 6 и 12 месеца този дял е в рамките 28 – 30%, докато при тези със средна и голяма давност на БТ ВД достатъчност се открива в над 40% от болните.
4. При пациентите с нормално тегло и затлъстяване се установи най-нисък процент на ВД дефицит (с изключение на БТ над 120 месеца , където ВД дефицит липсва при болните с поднормено тегло, нормална телесна маса, затлъстяване 2 ст.).

Фигура 25. Разпределение по ВД статус, ИТМ при пациентите с различна давност на БТ

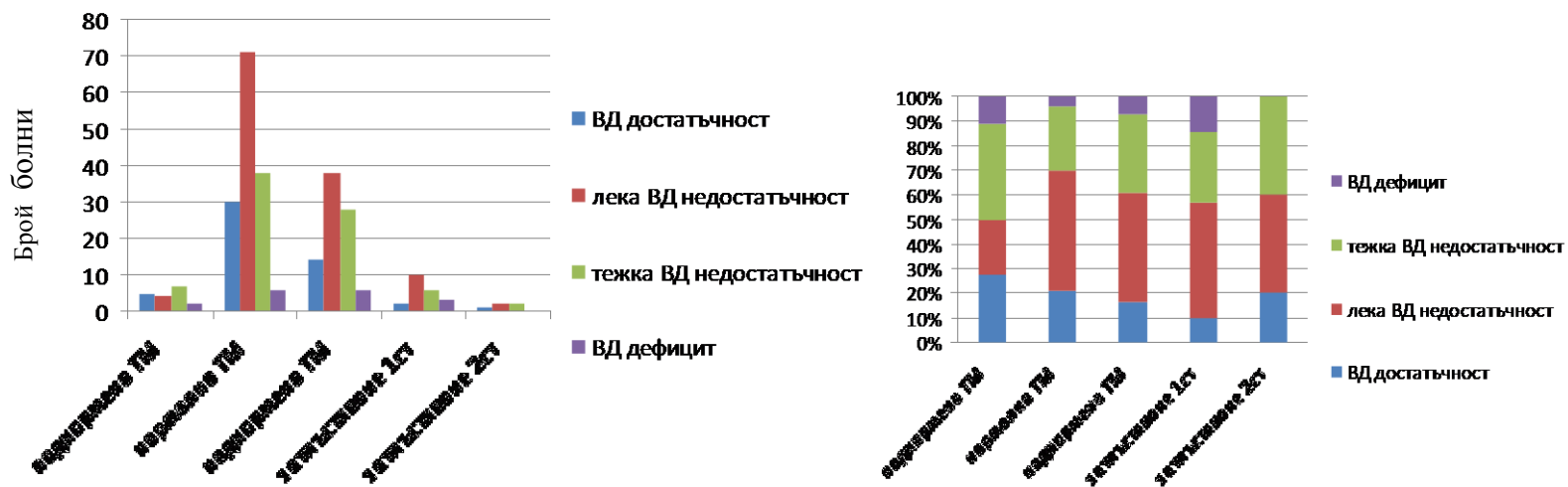
А. Давност над 6 месеца, n=289



ТМ – телесна маса, ВД – витамин Д

Фигура 25 – продължение

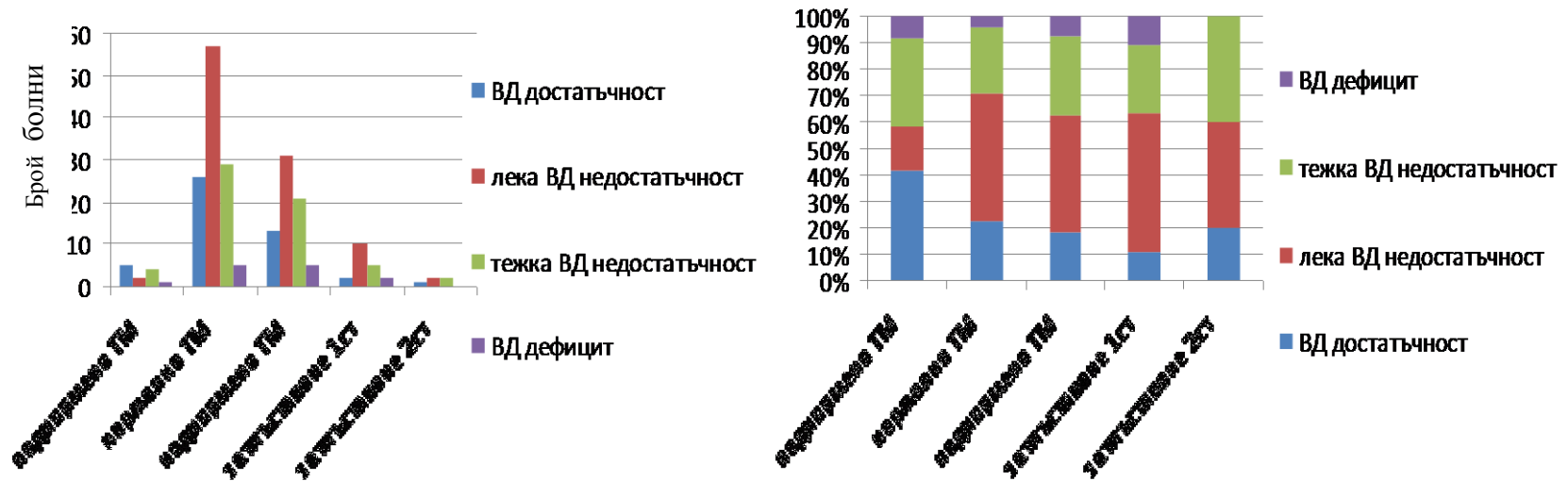
Б. Давност на БТ над 12 месеца, n=275



ТМ – телесна маса, ВД витамин Д

Фигура 25 - продължение

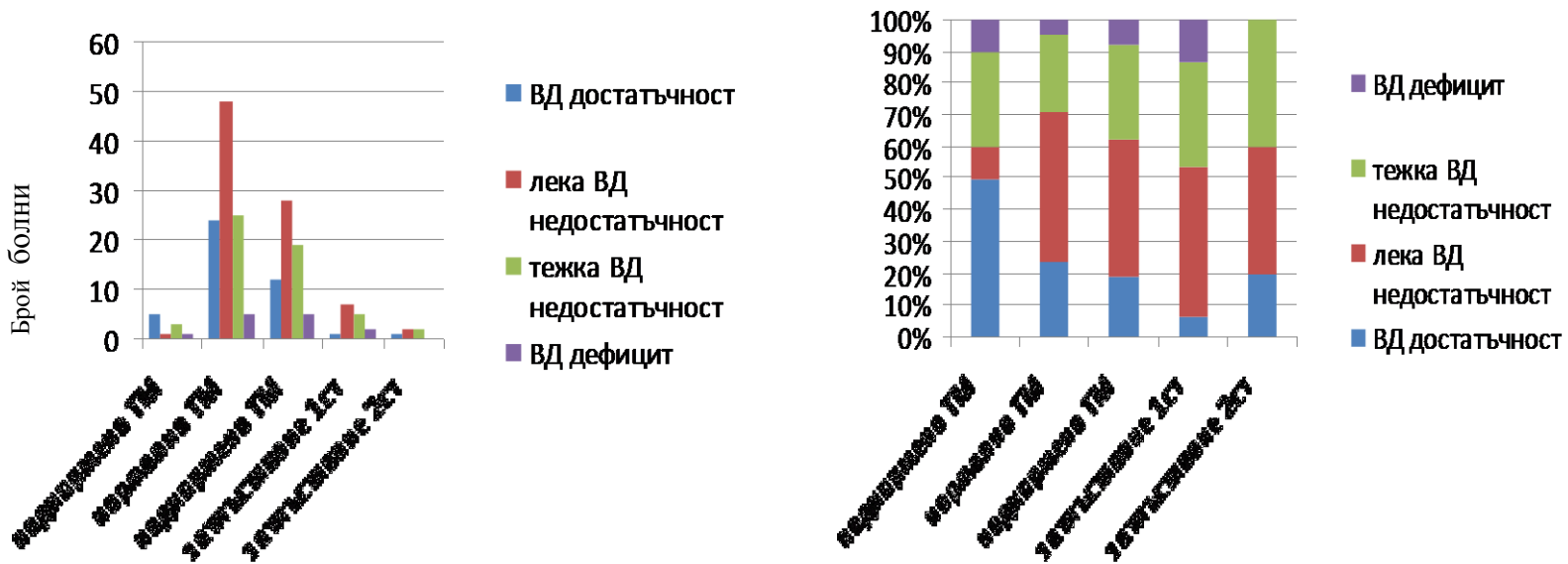
В. Давност на БТ над 36 месеца, n=223



ТМ – телесна маса, ВД витамин Д

Фигура 25 - продължение

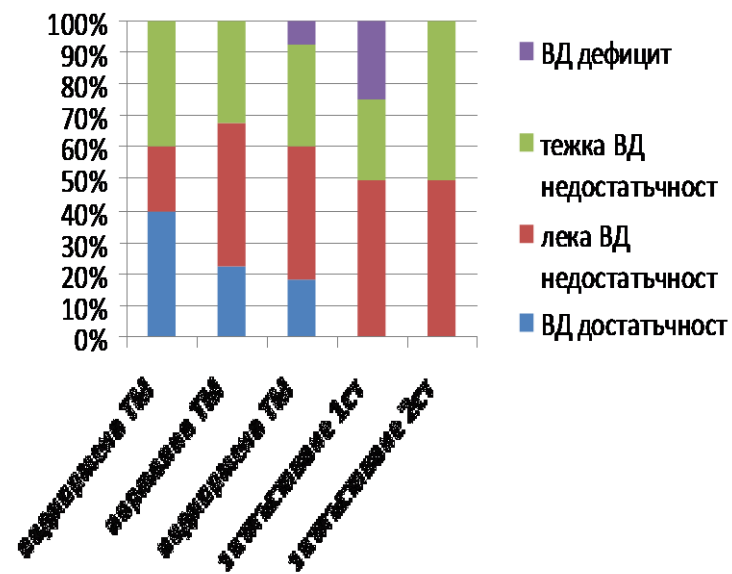
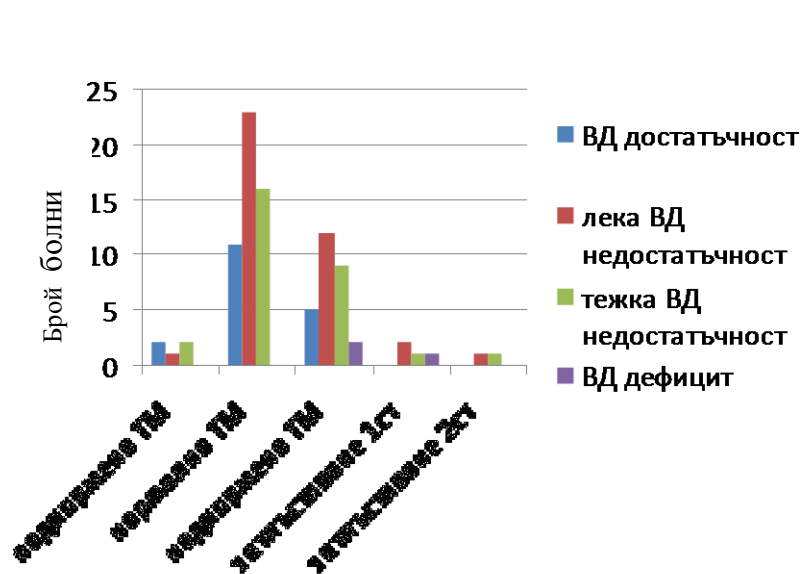
Г. Давност на БТ над 60 месеца, n=196



ТМ – телесна маса, ВД - Витамин Д

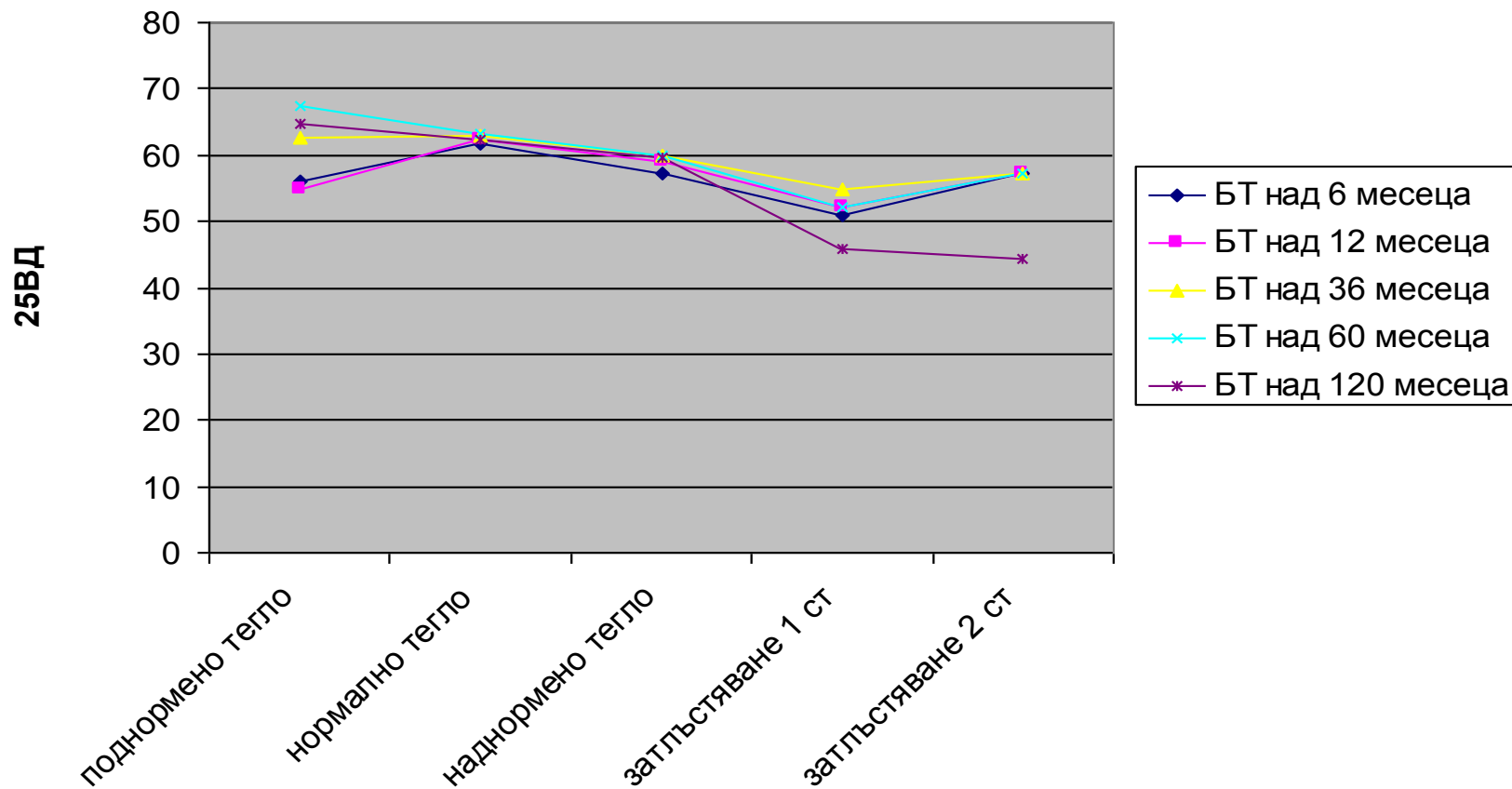
Фигура 25 – продължение

Д. Давност на БТ над 120 месеца, n=89



ТМ – телесна маса, ВД витамин Д

Графика 11. Динамика в средните стойности на 25ВД според ИТМ статус



5. При пациентите с по-ниска ИТМ се отчитат по-високи средни стойности на 25ВД.
6. Най-ниски средни стойности на 25ВД се отчитат при болните със затлъстяване 1 ст, следвани от пациентите със затлъстяване 2 ст.
7. Анализът на болните със затлъстяване 2 ст трябва да се прави внимателно с оглед малкият брой пациенти с това отклонение на ИТМ.

### **6.7. Влияние на ЗД върху ВД статуса при пациенти с БТ**

Разгледахме ролята на ЗД и гликемичният контрол върху 25ВД в двете групи, в които се установява значим ефект на ЗД от регресионният анализ – болните с давност на БТ над 6 месеца и над 12 месеца.

#### **6.7.1. Подбор на пациентите – давност на БТ над 6 месеца**

В първия етап се проведе описаната вече селекция на пациентите по т. 5.1.1. От общата група (n=395) се селектираха 289 пациента.

На втория етап подбрахме само пациентите със ЗД, изпълняващи гореописаните условия. Селектирахме диабетици с всички видове терапия на ЗД (n=40). Възможните терапевтични схеми на ЗД са описани в по-долната таблица.

Таблица 30. Терапевтични антидиабетични схеми при пациенти с БТ и ЗД, n=40.

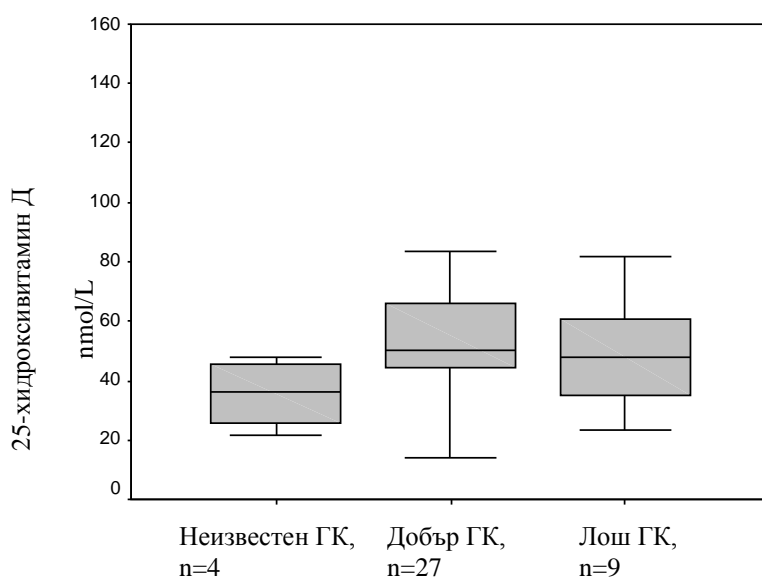
Вид лечение	Брой болни
Инсулинолечение	27
Диетолечение	5
Метформин	2
Сулфанилурейни препарати	2
Акарбоза	3
Трансплантация панкреас	1

За оценка на влиянието на гликемичният контрол (ГК) Болните бяха разделени на две групи според ГК, като граница за добър ГК беше приета стойност на гликиран хемоглобин (HbA1c) под 7.5% според препоръките на Американската Асоциация по Захарен Диабет (ADA) (13). Болните бяха уеднаквени по доказаните вече предиктори за нивото на 25ВД от проведения регресионен анализ.

### 6.7.2. Резултати – пациенти с БТ над 6 месеца.

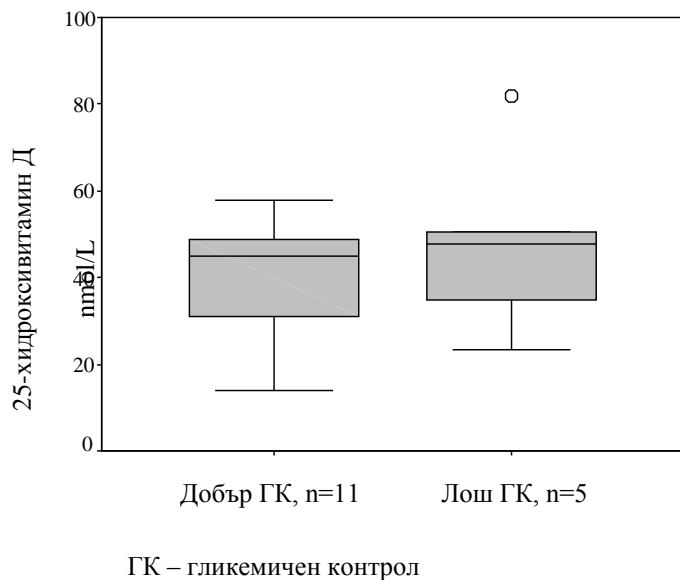
Бяха селектирани 40 пациента (М 28, Ж 12). От тях с добър ГК бяха 27, с лош – 9, за 4 мъже нямаше данни за гликирания хемоглобин. Средното ниво на 25ВД при пациентите с добър ГК е  $55.06 \pm 24.21 \text{ nmol/L}$ , с лош контрол е  $52.01 \pm 27.44 \text{ nmol/L}$ . Разликата в средните нива на 25ВД не е статистически значима ( $p=0.550$ ). Резултатите за средните стойности на 25ВД в двете групи болни, както и при тези с липса на данни за HbA1c са посочени във фигура 26.

Фигура 26. Средни нива на 25ВД според ГК



За уточняване ролята на ГК върху 25ВД уеднаквихме болните със ЗД по доказаните предиктори на 25ВД, доказани с регресионен анализ – пол, калциневринови инхибитори, сезонност, ИТМ. По този начин се селектираха 16 болни (11 с добър ГК, 5 с лош ГК). Отново не се установи значима разлика в групите според контрола на ЗД,  $p=0.553$ , фиг.27(Mann-Whitney U test)

Фигура 27. Средни нива на 25 според ГК, пациенти с БТ над 6 месеца, уедначени по другите предиктори за 25ВД.



### 6.7.3. Резултати при пациенти с БТ над 12 месеца

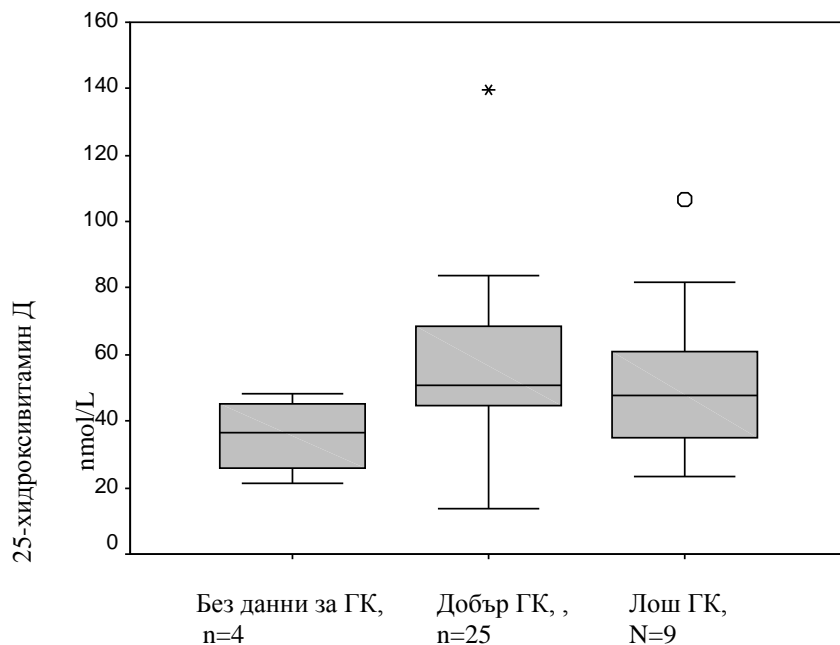
При първата селекция на боолните по точка 5.1.1., но с давност на БТ над 12 месеца се селектираха 275 болни. В тази група болни факторите, влияещи на 25ВД са сезонност, захарен диабет, ИТМ, женски пол. На вторият етап се подбраха само болните със ЗД, изпълняващи посочените по-горе условия. Селектираха се 38 болни, 25 от които – с добър ГК, 9 – с лош ГК, за 4 болни нямаше данни за ГК. Преобладаващата част от пациентите бяха на лечение с инсулин (табл. 31).

Табл.31. Видове лечение на ЗД при пациенти с БТ, давност над 12 месеца

Вид лечение	Брой болни
Инсулинолечение	26
Диетолечение	5
Метформин	2
Сулфанилурейни препарати	2
Акарбоза	3

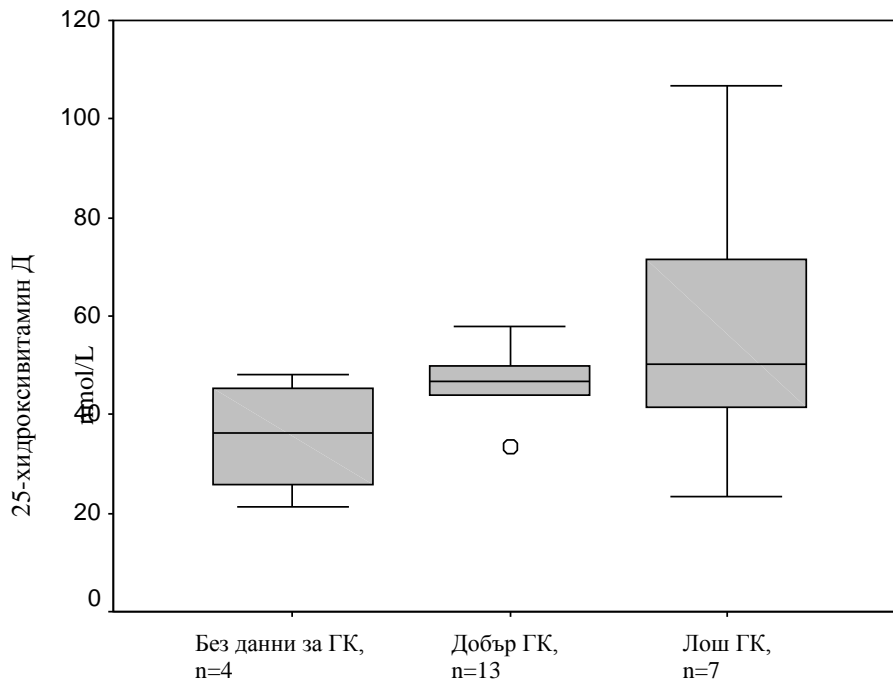
Средното ниво на 25ВД при пациенти с добър ГК е  $56.65 \pm 24.27$  nmol/L, с лош ГК –  $52.01 \pm 27.44$  nmol/L. Не се установи значима разлика между стойностите в двете групи, въпреки леко по-високото ниво при болните с добър ГК ( $p=0.514$ ). Средните стойности на 25ВД в тази група болни със ЗД и БТ са показани във фигура 28.

Фиг. 28. Средни нива на 25ВД при пациенти с БТ над 12 месеца и ЗД



За по-точна оценка на ефекта на ГК върху 25ВД уеднаквихме болните по статистически значимите фактори, влияещи на 25ВД при пациенти с БТ над 12 месеца. За разлика от предходната група (БТ над 6 месеца) имуносупресията е незначим фактор за 25ВД при БТ над 12 месеца. В резултат на тази селекция се подбраха 20 болни, 13 с добър ГК контрол, 7 – с лош ГК. Средното ниво на 25ВД при добър ГК беше  $43.69 \pm 11.86$  nmol/L, с лош ГК  $58.00 \pm 28.41$  nmol/L, разликата е статистически незначима ( $p=0.219$ , Mann-Whitney U test), фигура 29.

Фигура 29. Средни 25ВД нива в групите според ГК, БТ над 12 месеца



#### 6.7.4. Заключение

Въз основа на посочените по-горе резултати може да се направят следните заключения:

1. Делът на пациентите със ЗД е в рамките на 13.84 – 13.81% съответно за давност на БТ над 6 и над 12 месеца
2. Преобладаващата част от пациентите са на терапия с Инсулин.
3. Болните с добър ГК са близо 3 пъти повече от болните с лош ГК в общите популации, а след уеднаквяване по другите фактори, влияещи на 25ВД – близо 2 пъти повече.
4. Различията в средното ниво на 25ВД в групите с добър и лош ГК не са статистически значими. Това се запазва и след уеднаквяване на болните по сругите предиктори на 25ВД.
5. Трябва да се отбележи и славнително малкият брой на пациентите в тези проучвания.

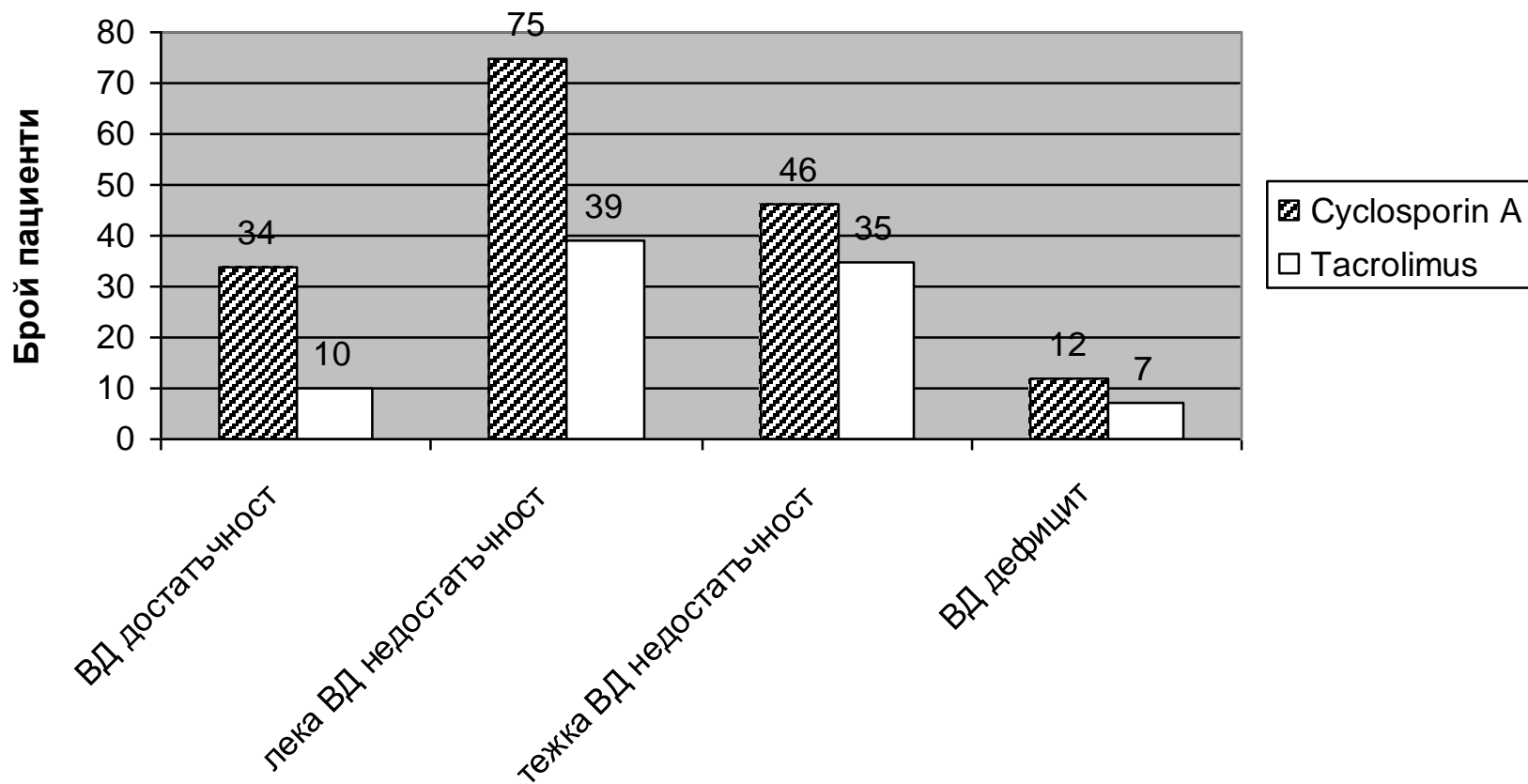
## **6.8. Влияние на имunosупресивната терапия върху 25ВД**

Нашите резултати поазват статистически значимо влияние на калциневриновите инхибитори върху 25ВД при бъбречнотрансплантираните с давност над 6 месеца и над 60 месеца. По-долу ще бъдат разгледани двете групи от болни. Другите имunosупресори не показаха влияние върху 25ВД.

### **6.8.1. Имunosупресори и 25ВД при пациенти с давност на БТ над 6 месеца**

В тази група приемът на Так и ЦсА се свързва с по-ниски нива на 25ВД (табл. 17). Селектирахме болните на терапия с КНИ в тази група (n=258). Разпределението на пациентите според ВД статуса и имunosупресивната терапия (ЦсА или Так) е посочена на фиг. 30. Болните на Циклоспорин А преобладават във всички групи според нивото на 25ВД. По-изразена е разликата при ВД достатъчност и лека ВД недостатъчност, а по-малка при тежките форми на ВД недостатъчност.

Фигура 30. Разпределение на болните според ВД статус и прием на калциневринови инхибитори, n=258.



За сравняване влиянието на Так и ЦсА върху 25ВД изследвахме средните стойности на 25 ВД в двете групи според вида на КНИ. Не се установи статистически значима разлика между нивото на 25ВД ( $p=0.150$ , табл. 32)

Табл.32. Средни стойности на 25ВД при пациенти на терапия с КНИ

Терапия	Брой болни	Средно ниво 25ВД	SE	p
Такролимус	91	55.51±20.72	2.17	0.150
Циклоспорин А	167	59.92±24.82	1.92	

SE – стандартна грешка

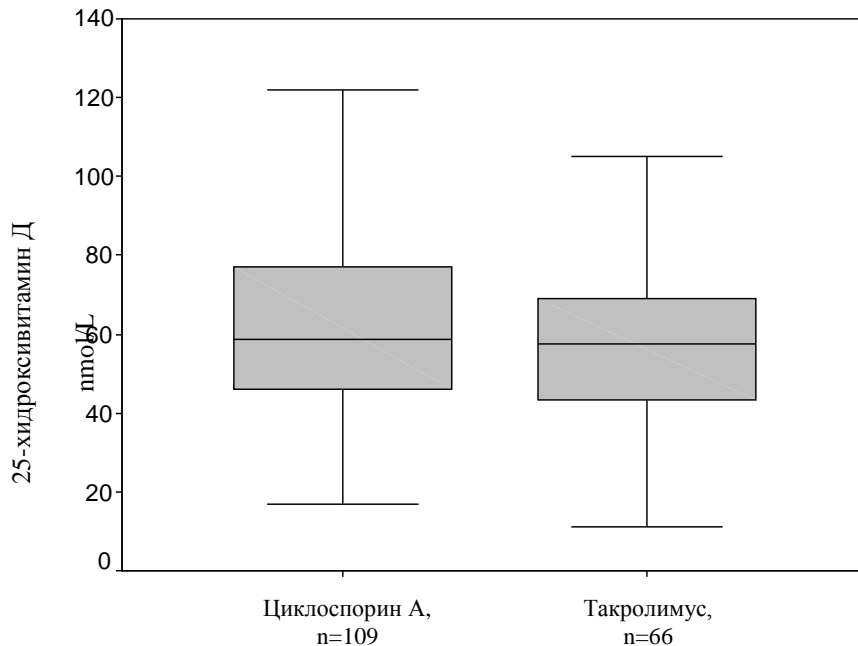
За по-точното уточняване на различията между Так и ЦсА, уеднаквихме пациентите по другите значими фактори, влияещи на 25ВД – пол, сезонност, ИТМ, захарен диабет. Селектираха се 175 бъбречнотрансплантирани. Отново не се установи статистически значима разлика между групите на терапия с Так и с ЦсА, въпреки че средното ниво на 25ВД в групата с Так е по-ниско,  $p=0.143$ . (табл. 33, фиг. 31).

Табл. 33. Средни стойности при Так и ЦсА след уеднаквяване,  $n=175$

Терапия	Брой болни	Средно ниво 25ВД	SE	p
Такролимус	66	56.60±18.30	2.25	0.143
Циклоспорин А	109	61.71±24.39	2.34	

SE – стандартна грешка

Фигура 31. Средни нива на 25ВД при терапия с Так и ЦсА, след уеднаквяване,  $n=175$ .

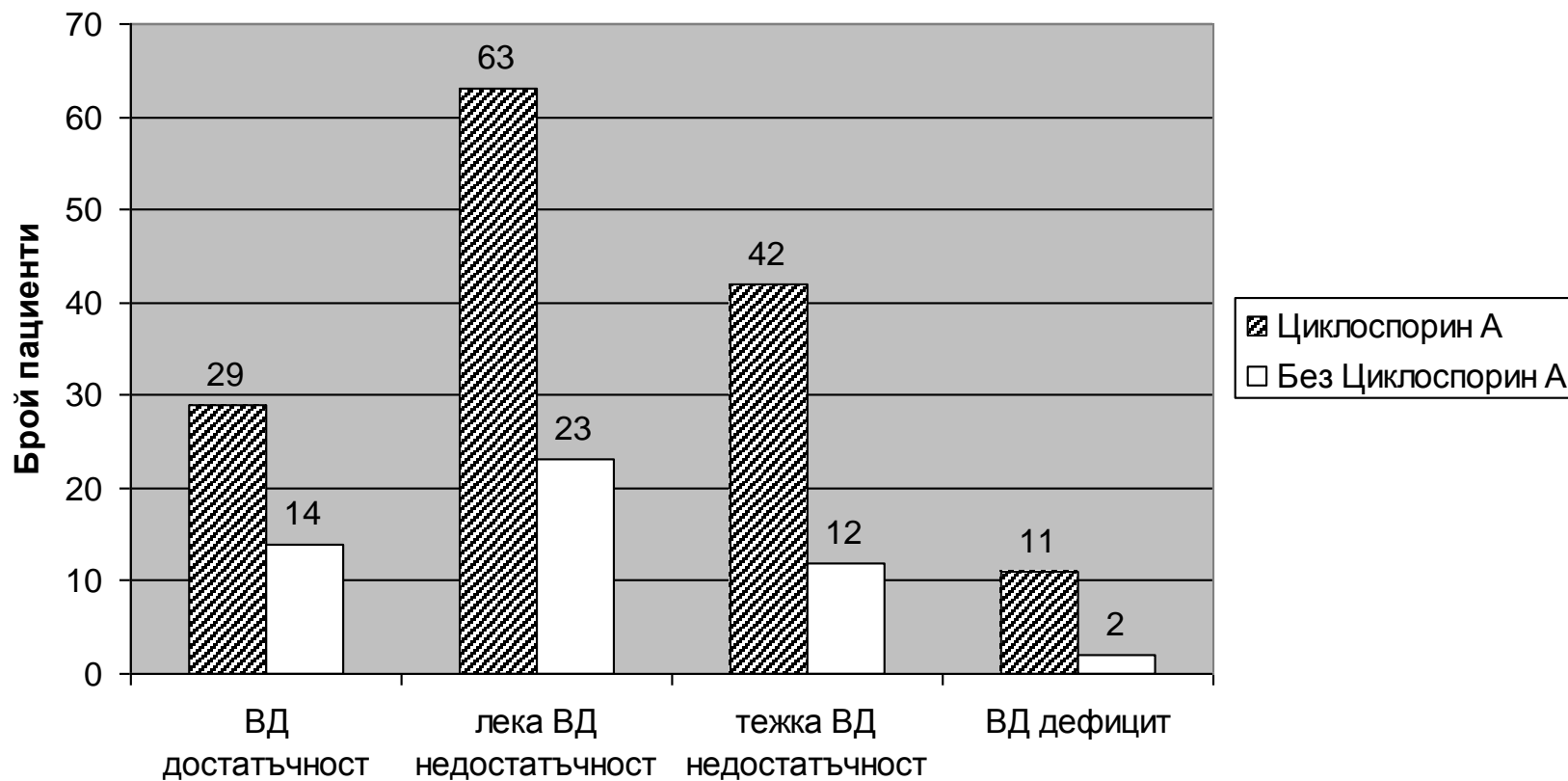


Взимайки в предвид влиянието приема на ЦсА и Так върху 25ВД, решихме да проверим връзката на нивата на двата имunosупресора и 25ВД. Отново се използва многофакторен регресионен анализ. Не се установи сигнификантна връзка между нивото на Так и ЦсА и 25ВД ( $\beta$  за Так  $-0.006$ ,  $\beta$  за ЦсА  $0.00$ ,  $p > 0.05$ ).

### 6.8.2. Имunosупресори и 25ВД при пациенти с БТ, давност над 60 месеца

Болните в тази група са общо 196. Факторите, влияещи на 25ВД при БТ над 60 месеца са сезонност (тестуване за ВД през юли, август, септември), ИТМ, женски пол, прием на ЦсА. Най-честото отклонение във ВД статуса е лека ВД недостатъчност. Болните с ЦсА преобладават ( $n=145$ ), като те доминират във всички групи според ВД статуса спрямо другите болни (на Так или м-TOR инхибитор)(фигура 32). Най-голяма разлика в броя на пациентите на ЦсА и на друг КНИ/м-TOR-инхибитор е в групата с лека и тежка недостатъчност.

Фигура 32. Разпределение според приема на ЦсА и ВД статуса, БТ над 60 месеца, n=196.



Първоначално не се установи значима разлика в следното ниво на 25ВД при пациентите лекувани с ЦсА и на терапия с Так/mTOR инхибитори (табл. 34).

Табл. 34. 25ВД при пациенти на ЦсА и Так/mTOR инхибитори, БТ над 60 месеца, n=196

Терапия	Брой болни	Средно ниво 25ВД	SE	p
Так/mTOR инхибитор	51	65.04±23.20	2.10	0.207
Циклоспорин А	145	59.93±25.29	3.25	

SE – стандартна грешка

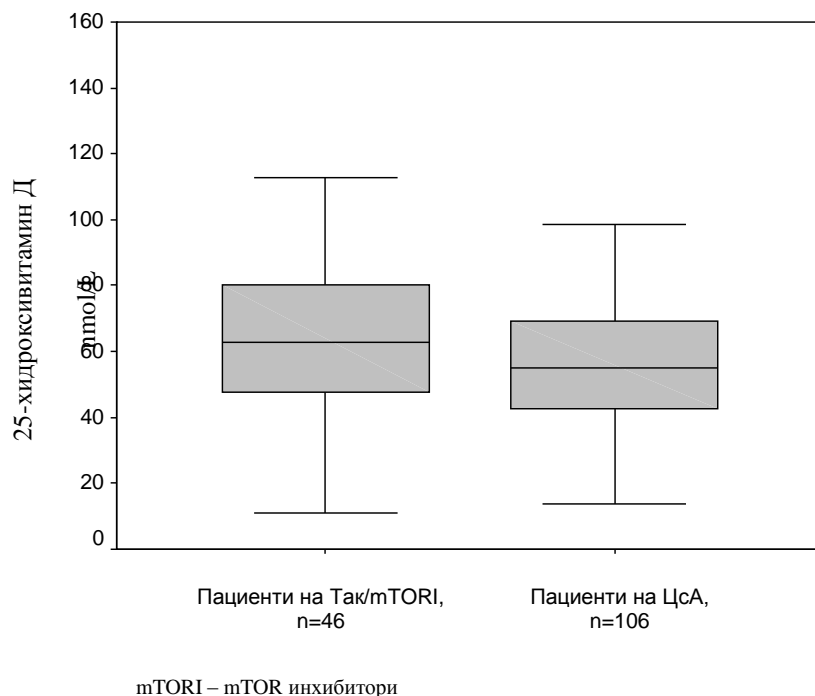
За по-точно установяване ефекта на ЦсА уеднаквихме двете групи пациенти според другите предиктори на 25ВД – пол, сезонност, ИТМ. Селектираха се 152 болни. В тази група нивото на 25ВД при пациентите с ЦсА е значимо по-ниско спрямо групата с Так/mTOR инхибитор (вж табл. 35, фигура 33, Т-тест с независими променливи).

Табл. 35. Сравнение на 25ВД, след уеднаквяване по другите предиктори, n=152

Терапия	Брой болни	Средно ниво 25ВД	SE	p
Так/mTOR инхибитор	46	64.40±23.39	3.44	0.041
Циклоспорин А	106	59.99±22.95	2.29	

SE – стандартна грешка

Фиг. 33. Разлики в 25ВД, БТ над 60 месеца, n=152



И в тази група чрез многофакторен регресионен анализ се тества влиянието нивото на ЦсА върху 25ВД. Тук се установи значимо влияние ( $p < 0.05$ ), но при ниска абсолютна стойност на  $\beta$  (табл. 36).

Табл. 36. Влияние на ЦсА – нивото върху 25ВД, БТ над 60 месеца.

	$\beta$	Std. Error	P
Свободна константа $\alpha$	5.704	0.534	<0.001
Женски пол	-0.287	0.060	<0.001
Ниво на ЦсА	-0.003	0.001	0.012
Юли	0.227	0.105	0.032
Август	0.490	0.086	<0.001
Септември	0.277	0.090	0.002
ln ИТМ	-1.154	0.384	0.003

### **6.8.3. Заключение**

Посочените по-горе данни позволяват да се направят следните изводи:

1. Потвърждава се извода, че лечението с КН И при пациенти с БТ над 6 и 60 месечна давност на БТ е свързано с по-ниски нива на 25ВД
2. В групата с давност над 6 месеца Так и ЦсА се асоциират със сходен ефект върху 25ВД. С оглед на факта, че ЦсА влияе на ВД статуса при болните с давност на БТ над 60 месеца, може да се каже, че ЦсА е с по-голям ефект от Так върху 25ВД
3. Не се установи значимо влияние на серумните нива на двата имуносупресора върху ВД статуса.

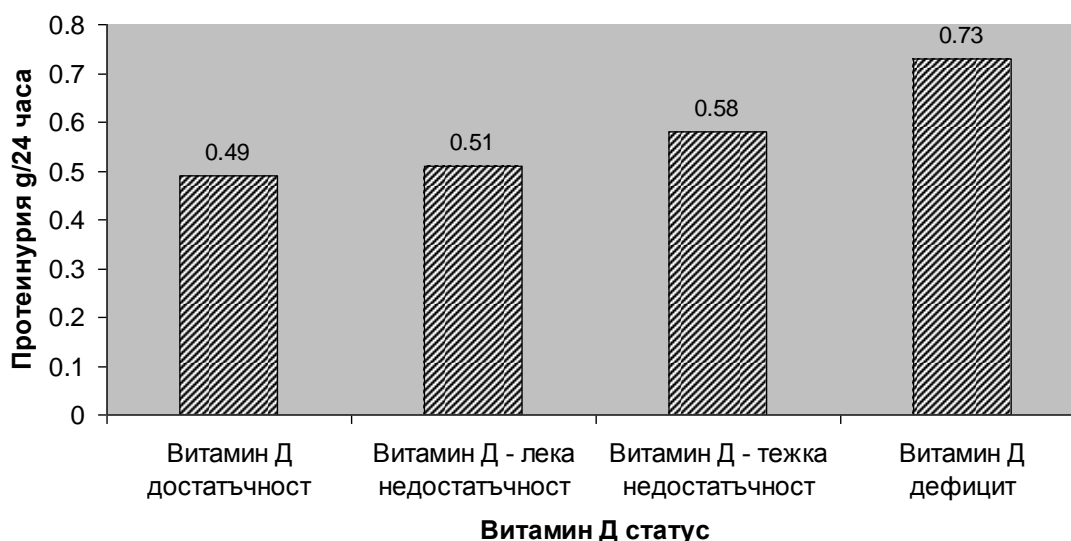
### **6.9. Влияние на ВД върху протеинурията**

Протеинурията представлява важен показател, свързан с преживяемостта на нативните бъбреци, трансплантата и пациента. С оглед на данните за влияние на витамин Д върху протеинурията при нативни бъбреци, поставихме си за цел да проверим влиянието на 25ВД върху протеинурията при трансплантирани пациенти. Разгледахме отново различните периоди след БТ – БТ с давност над 6 месеца, над 12 месеца, над 36 месеца, над 60 и 120 месеца. Към гореизброените фактори оценихме още влиянието на приема на АСЕи (инхибитори на ангиотензин I конвертиращият ензим) и АРБ (блокери на рецептора за ангиотензин II), приема на блокери на калциевите канали (БКК; отделно бяха оценени дихидропиридинови, недихидропиридинови), систолно и диастолно артериално налягане, измерени по време на прегледа в ДБТ.

#### **6.9.1. Влияние на 25ВД върху протеинурията при пациенти с давност на БТ над 6 месеца**

Тук са включени всички първоначално селектирани болни (n=289). Първоначалните данни показаха по-висока протеинурия при по-ниски нива на 25ВД. Средната протеинурия при пациенти с ВД достатъчност е 0.49 гр/л, в сравнение с 0.73гр/л при пациенти с ВД дефицит. Данните са показани на фиг. 34.

Фиг. 34. Протеинурия при различните форми на ВД недостатъчност, давност на БТ над 6 месеца, n=289.



С оглед на многото фактори, влияещи на протеинурията при пациенти с БТ, отново се използва многофакторен регресионен анализ с цел откриване на всички значими фактори, повлияващи този лабораторен показател. Резултатите за пациенти с давност на БТ над 6 месеца са представени в таблицата по-долу.

Табл. 37. Значими фактори, повлияващи протеинурията при пациенти с давност на БТ над 6 месеца, n=289.

Фактор	$\beta$	Std. Error	P
Свободна константа $\alpha$	3.772	0.887	<0.001
Захарен Диабет	0.412	0.173	0.018
Възраст (години)	-0.011	0.004	0.007
Реакции на отхвърляне	0.897	0.250	<0.001
Прием на mTOR инхибитори	0.446	0.166	0.008
Прием на стероиди (ежедневен прием)	-0.281	0.131	0.033
ln 25ВД	-0.278	0.120	0.022
ln иГФ (СКД-ЕРІ формула)	-0.846	0.123	<0.001
Систолно АН	0.015	0.004	<0.001

25ВД – 25-хидроксивитамин Д, иГФ - изчислена гломерулна филтрация, АН – артериално налягане

Резултатите демонстрират по-висока протеинурия при захарен диабет, прием на mTOR инхибитори, при реакции на отхвърляне в рамките на 12 месеца от изследването за 25ВД, както и при по високо систолно АН. По-ниска протеинурия се установява при по-добра бъбречна функция (по-висока иГФ), по-добър ВД статус, при пациенти с поддържаща доза стероиди и с по-висока възраст.

Останалите изследвани фактори не показаха значимо влияние върху протеинурията, включително използването на АСЕи или АРБ ( $p=0.313$ ), използването на дихидропиридинови и недихидропиридинови БКК (съответни стойности за  $p$  0.882 и 0.991), диастолно АН ( $p=0.67$ ).

### **6.9.2. Влияние на ВД върху протеинурията при пациенти с давност на БТ над 12 месеца**

В тази група болни бяха селектирани 275 болни. Отново най-ниска протеинурия се установи при пациентите с ВД достатъчност (0.46гр/24 часа), а най-висока при пациентите с ВД дефицит (0.83 гр/24 часа). Резултатите, демонстриращи протеинурията при различните форми на ВД статус са представени в фиг. 36.

И в тази група се проведе многофакторен регресионен анализ с цел установяване на значимите фактори, влияещи на белтъчната уринна екскреция при пациентите с БТ с давност над 12 месеца. Резултатите от анализа са представени в таблица 38.

Фиг. 35. Протеинурия при различните форми на ВД недостатъчност, давност на БТ над 12 месеца,  $n=275$

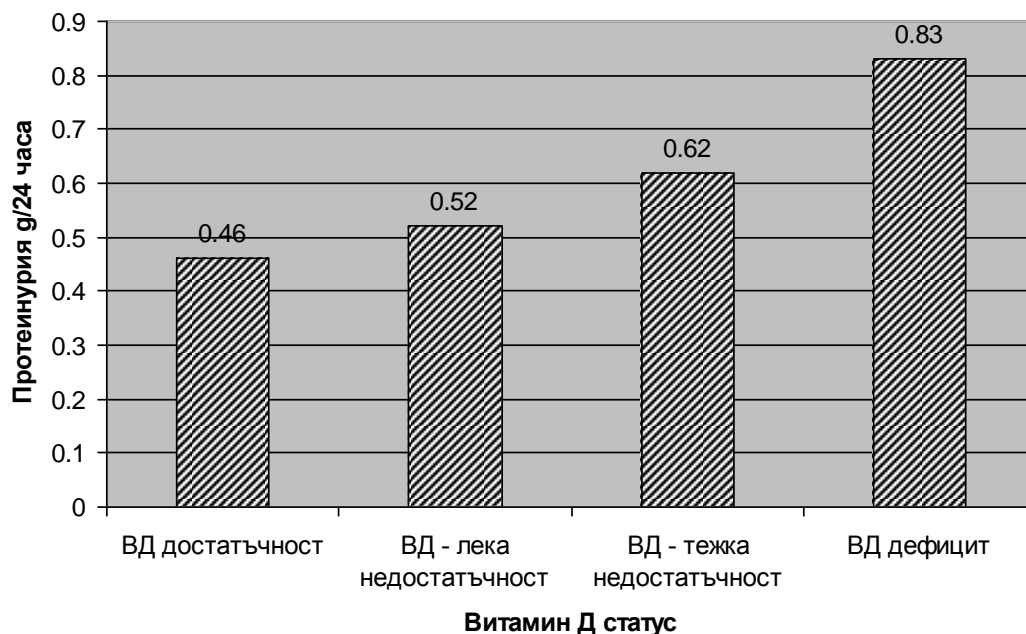


Табл. 38. Значими фактори, повлияващи протеинурията при пациенти с давност на БТ над 12 месеца, n=275.

Фактор	$\beta$	Std. Error	P
Свободна константа $\alpha$	3.544	0.900	<0.001
Захарен Диабет	0.458	0.177	0.010
Възраст (години)	-0.013	0.004	0.003
Реакции на отхвърляне	1.101	0.275	<0.001
Прием на mTOR инхибитори	0.420	0.168	0.013
ln 25ВД	-0.349	0.126	0.006
ln иГФ (СКД-ЕРІ формула)	-0.807	0.129	<0.001
Систолно АН	0.017	0.004	<0.001

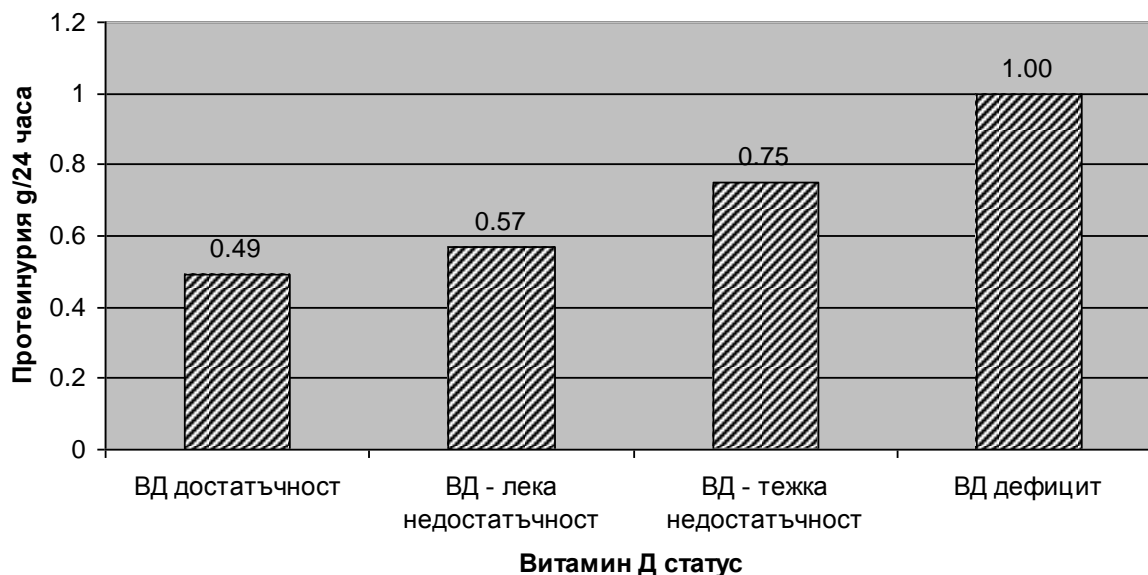
25ВД – 25-хидроксивитамин Д, иГФ - изчислена гломерулна филтрация, АН – артериално налягане

Резултатите в тази група са сходни на тези в предходната, като се запазва значимата връзка между по-ниската протеинурия при по-високи нива на 25ВД. За разлика от пациентите с давност на БТ над 6 месеца, ежедневният прием на стероиди в тази група не оказва статистически значимо влияние върху протеинурията, въпреки, че стойността на p е близо до статистически значимата стойности (p=0.051).

### 6.9.3. Влияние на ВД върху протеинурията при давност на БТ над 36 месеца

Пациентите селектирани в тази група са 223. Потвърждават се резултатите от предходните две групи пациенти за по-висока протеинурия при пациентите с по-лош ВД статус. При бъбречнотрансплантираните с ВД достатъчност протеинурията е 0.49/24 часа, докато при пациентите с ВД дефицит нейното ниво е повече от два пъти по-високо (1.00гр/24 часа). Резултатите са обобщени във фигура 36.

Фиг. 36. Разпределение на протеинурията според ВД статуса, давност на БТ над 36 месеца, n=223.



Проведеният регресионен анализ показва промяна във факторите, влияещи на уринната белтъчна екскреция. За разлика от предходните две групи пациенти, използването на mTOR инхибитори е с несигнификантен ефект върху протеинурията при селектираните по описаните по-горе критерии и давност на БТ над 36 месеца ( $p=0.081$ ), докато влиянието на 25ВД остава значимо (вж. табл. 39).

Табл. 39. Значими фактори, повлияващи протеинурията при пациенти с давност на БТ над 36 месеца, n=223.

Фактор	$\beta$	Std. Error	P
Свободна константа $\alpha$	3.668	1.003	<0.001
Захарен Диабет	0.586	0.214	0.007
Възраст (години)	-0.016	0.005	0.002
Реакции на отхвърляне	1.150	0.327	0.001
ln 25ВД	-0.292	0.140	0.039
ln иГФ (СКД-ЕРІ формула)	-0.871	0.148	<0.001
Систолно АН	0.018	0.005	<0.001

25ВД – 25-хидроксивитамин Д, иГФ - изчислена гломерулна филтрация, АН – артериално налягане

#### **6.9.4. Влияние на ВД върху протеинурията при пациенти с БТ над 60 месеца**

Селектирани бяха 196 пациента. При бъбречнотрансплантираните с ВД достатъчност се установи протеинурия 0.52 гр/24 часа, при тези с лека недостатъчност – 0.57 гр/24 часа, при тежка недостатъчност – 0.83 гр/24 часа, при ВД дефицит – 1.00 гр/24 часа – данните са обобщени във фигура 37.

Регресионният анализ демонстрира същите значими фактори, които бяха доказани в групата с давност на БТ над 36 месеца. Отново нивото на 25ВД повлиява значимо протеинурията след БТ,  $p=0.026$  (табл. 40).

Фиг. 37. Разпределение на протеинурията според ВД статуса, давност на БТ над 60 месеца, n=196.

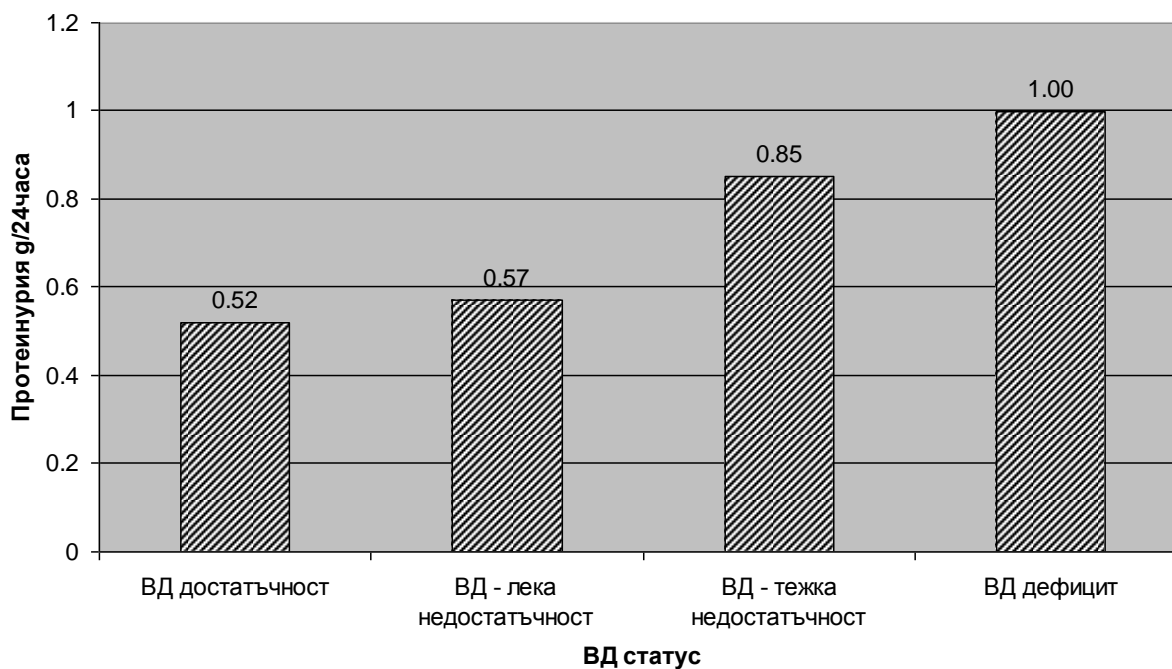


Табл. 40. Значими фактори, повлияващи протеинурията при пациенти с давност на БТ над 60 месеца, n=196.

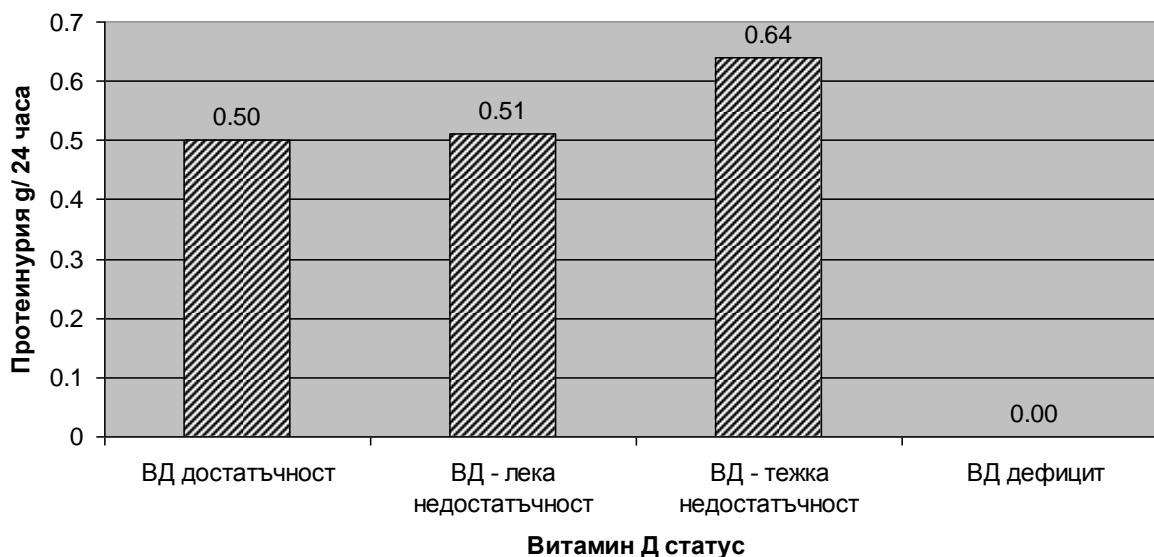
Фактор	$\beta$	Std. Error	P
Свободна константа $\alpha$	3.479	1.090	0.002
Захарен Диабет	0.587	0.230	0.012
Възраст (години)	-0.018	0.006	0.002
Реакции на отхвърляне	1.149	0.362	0.002
ln 25ВД	-0.338	0.151	0.026
ln иГФ (СКД-ЕРІ формула)	-0.832	0.163	<0.001
Систолно АН	0.021	0.005	<0.001

25ВД – 25-хидроксивитамин Д, иГФ - изчислена гломерулна филтрация, АН – артериално налягане

### 6.9.5. Влияние на ВД върху протеинурията при пациенти с БТ над 120 месеца

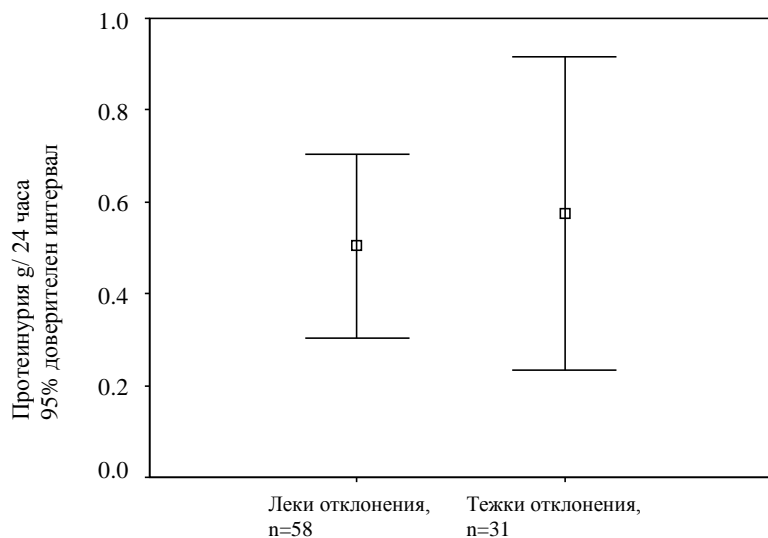
В тази група се селектираха 89 пациента. Разпределението на протеинурията за 24 часа според ВД статуса е обобщено в таблицата по-долу.

Фиг. 38. Разпределение на протеинурията според ВД статуса, давност на БТ над 120 месеца, n=89.



Отново е налице плавно покачване на протеинурията с влошаване на ВД статуса. Тук, за разлика от останалите групи се отбелязва протеинурия 0гр/24 часа при пациентите с ВД дефицит. Поради ниската численост на тези болни (n=3), тълкуването на данните за протеинурията при пациенти с ВД дефицит и БТ над 120 месеца е силно ограничено. За да преодолеем този проблем, обединихме пациентите с тежко нарушен ВД статус (ВД дефицит и ВД – тежка недостатъчност) и сравнихме тяхната уринна белтъчна екскреция с тази на пациентите с леко нарушение (лека ВД недостатъчност, ВД достатъчност). Средната протеинурия за 24 часа при пациентите с тежко нарушение на ВД статуса беше 0.58гр, при пациентите с леко ВД отклонение – 0.50 гр/24 часа, като разликата не е значима (p=0.697). Резултатът е показан на фигура 39.

Фиг. 39. Разлика в протеинурията при пациенти с леко и тежко отклонение във ВД статуса



Болните бяха уеднаквени по факторите, влияещи на 25ВД в тази група. Селектираха се 72 болни (29 с тежки и 43 с леки отклонения във ВД статуса). Средното ниво на 25ВД при болните с тежки отклонения е  $0.56 \pm 0.09$  nmol/L, а при тези с леки -  $0.48 \pm 0.08$  nmol/L. Отново разликата е статистически незначима ( $p=0.453$ , Mann-Whitney U test).

Данните от проведения регресионен анализ в групата с давност на БТ над 120 месеца е представен по-долу. Значими стойности за  $\beta$  се установяват за захарен диабет, систолно АН, възраст на пациентите в години, бъбречна функция.

Табл. 41. Фактори, влияещи върху протеинурията при пациенти с давност на БТ над 120 месеца, n=89.

Фактор	$\beta$	Std. Error	P
Захарен Диабет	0.505	0.249	0.046
Възраст (години)	-0.021	0.007	0.003
ln иГФ (СКД-ЕРІ формула)	-0.006	0.003	0.037
Систолно АН	0.015	0.003	<0.001

Въпреки че запазват своята значимост, влиянието на бъбречната функция и захарният диабет при пациенти с БТ над 120 месеца върху протеинурията намалява. Нивото на ВД не е значим фактор, повлияващ белтъчната екскреция в тази група болни ( $p=0.650$ ).

### 6.9.6. Заключение

След анализ на описаните по-горе резултати, може да се направят следните заключения:

1. По-лошият ВД статус се асоциира с по-високи нива на протеинурия при пациенти с БТ. Единственото изключение са болните с БТ с давност 120 месеца и ВД дефицит, но това е малка група болни (n=3).
2. Регресионният анализ потвърждава значимото влияние на 25ВД върху протеинурията при БТ, с изключение на болните с давност на БТ над 120 месеца.
3. Значимите фактори във всяка отделна група пациенти според давност на БТ са обобщени в табл. 42.

Табл. 42. Значими фактори, повлияващи протеинурията при различна давност на БТ.

Давност на БТ	Фактори							
	ЗД	mTORI	PO	Систолно АН	ВД Ниво	Бъбречна функция (иГФ)	Прием на стероиди	Възраст (години)
>6 Месеца	+	+	+	+	+	+	+	+
>12 месеца	+	+	+	+	+	+		+
>36 месеца	+		+	+	+	+		+
>60 месеца	+		+	+	+	+		+
>120 месеца	+			+		+		+

ЗД – захарен диабет, mTORI – mTOR инхибитори, АН – артериално налягане, иГФ - изчислена гломерулна филтрация, PO – реакция на отхвърляне

### 6.10. Влияние на ВД върху честотата на неоплазии при пациенти след бъбречна трансплантация

В тази част ще разгледаме влиянието на ВД върху честотата на неоплазии в селектираната група пациенти, като отново ще разгледаме пациентите според различната давност на БТ (над 6 месеца, над 12 месеца, над 36 месеца, над 60 и над 120 месеца). С оглед на значимостта на проблема (една от водещите причини за смъртност след БТ) ще

разгледаме пациенти с данни за малигнени неоплазии 12 месеца преди и 12 месеца след изследването за 25ВД, като по този начин ще се опита да оценим влиянието на ВД статуса за по-дълъг период от време (общо 24 месеца). Прие се, че изследването на ВД не влияе на честотата на неоплазии извън посочения времеви диапазон. Поради малкия брой на пациентите с неоплазии регресионен анализ не е провеждан в тази група, като бе използван теста на Mann – Whitney (Mann-Whitney U test)

### **6.10.1 Влияние на ВД върху честотата на неоплазии при пациенти с давност на БТ над 6 месеца**

От общо 289 пациента, 16 бяха с диагностицирана неоплазия (Нео). Разпределението на неоплазиите според органа са представени в табл. 43.

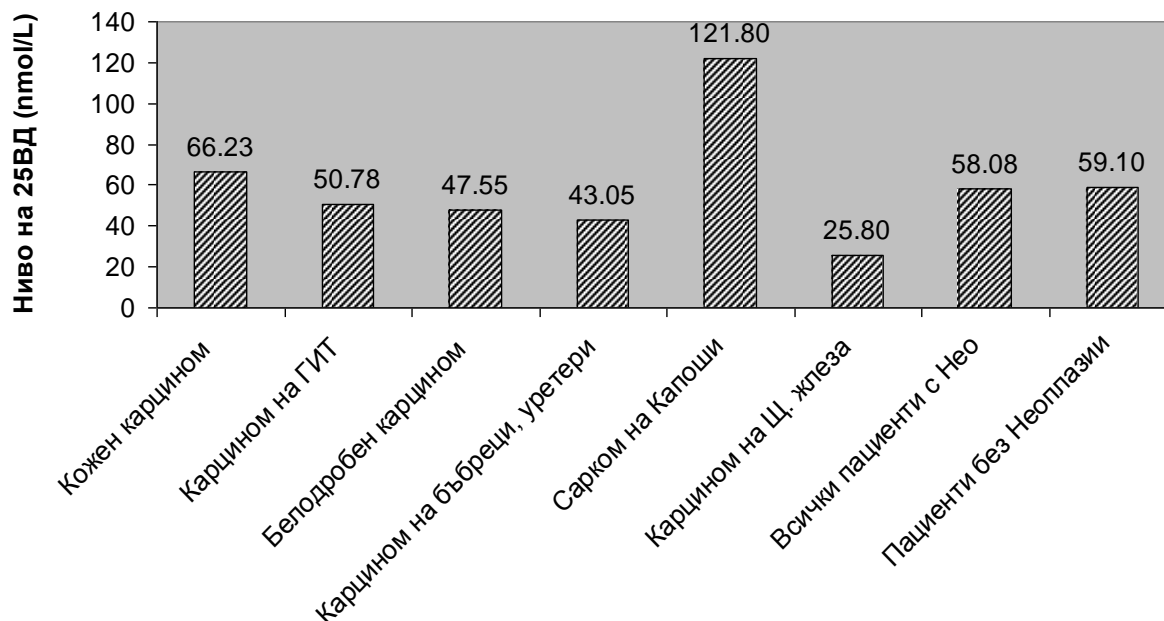
Табл. 43. Неоплазии при пациентите с давност на БТ над 6 месеца.

Вид неоплазия	Брой болни
Кожен карцином	6
Карцином с произход ГИТ	4
Карцином – бял дроб	2
Карцином – отделителна система и бъбреци	2
Карцином – Щитовидна жлеза	1
Сарком на Капоши	1

ГИТ – гастро-интестинален тракт

Средните нива на 25ВД при съответните видове Нео е показана на фигурата по-долу.

Фигура 40. Ниво на 25ВД според вида на Нео, n=289



С оглед на сравнително малкия брой на някои видове Нео (сарком, Карцином на Ш. жлеза) разгледахме нивата на 25ВД при всички пациенти с неоплазия, пациентите с кожни карциноми (карцинома базоцелуларе и карцинома спиноцелуларе) и пациенти с некожни тумори. При статистическата обработка и сравняването на 25ВД при пациентите без Нео се проведе уеднаквяване на изследваните групи според факторите, влияещи на нивото на 25ВД, описани в разделите по-горе (за пациентите с давност на БТ над 6 месеца – пол, сезонност, ЗД и др).

По този начин селектирахме общо 208 пациента, от които 11 бяха с малигнени заболявания (3 – с кожни сарциноми, 8 – с некожни неоплазии). Средните стойности на 25ВД в групите пациенти с и без Нео са дадени в таблицата по-долу.

Табл. 44. Средни нива на ВД при кожен, некожен и епителоидни Нео спрямо пациенти без Нео, БТ с давност над 6 месеца.

25ВД при пациенти с Нео		25ВД при пациенти без Нео, n=197	P (Mann-Whitney U test)
Кожни карциноми, n=3	62.33±23.56	53.21±20.68	0.543
Некожни Нео, n=8	42.05±15.12	53.21±20.68	0.131
Всички пациенти с Нео, n=11	47.58±18.99	53.21±20.68	0.333

Статистическият анализ не показва значима разлика в нивото на 25ВД при пациентите с Нео (цялата група, с кожни и некожни Нео) спрямо трансплантираните без малигнени заболявания.

### 6.10.2. Влияние на ВД върху честотата на неоплазии при пациенти с давност на БТ над 12 месеца

В тази група болни от общо 275 бъбречнотрансплантирани 16 са с доказано неопластично заболяване. Разпределението на болните по вид на неоплазията е показано на табл. 45.

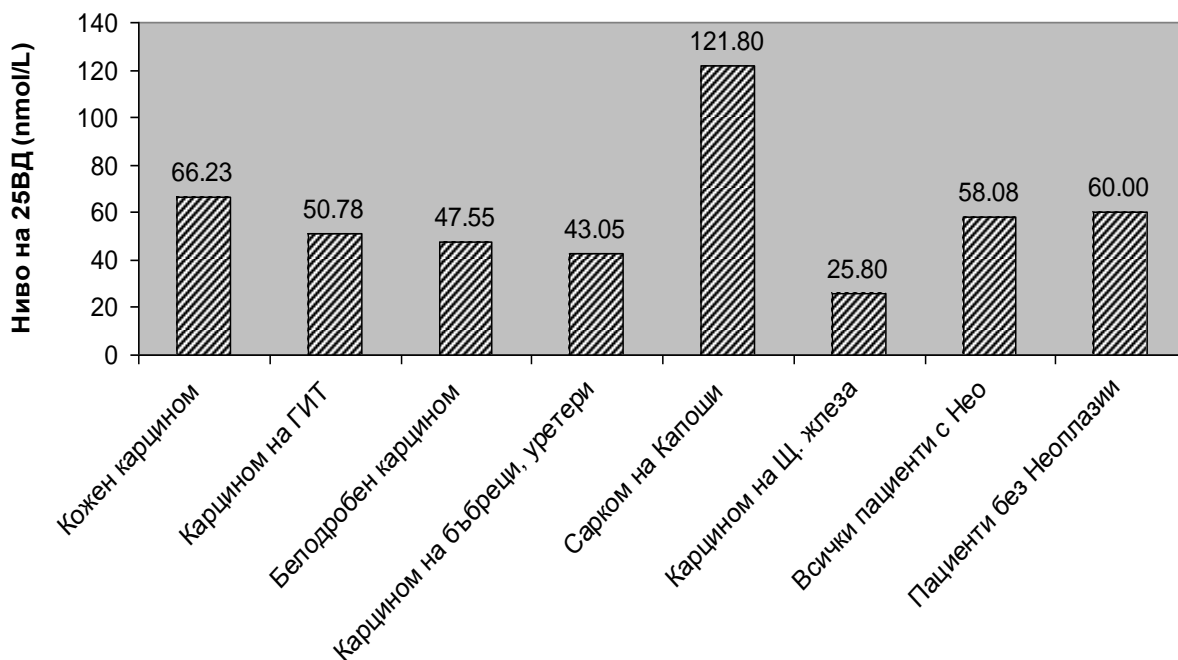
Табл. 45. Неоплазии при пациентите с давност на БТ над 12 месеца.

Вид неоплазия	Брой болни
Кожен карцином	6
Карцином с произход ГИТ	4
Карцином – бял дроб	2
Карцином – отделителна система и бъбреци	2
Карцином – Щитовидна жлеза	1
Сарком на Капоши	1

ГИТ – гастро-интестинален тракт

Средните нива на 25ВД при отделните групи Нео са показани на фиг. 41.

Фиг. 41. Средни нива на 25ВД според типа на Нео, пациенти с давност на БТ над 12 месеца



За оценка влиянието на 25 ВД върху честотата на Нео, болните бяха отново разделени в групи без Нео, всички пациенти с Нео, пациенти с кожни и некожни Нео. И тази група, аналогично на предходната, се проведе уеднаквяване на групите по отношение на факторите, влияещи на ВД статуса. След уеднаквяването бяха селектирани 195 пациента, от които 11 бяха с Нео (8 с некожни епителоидни и 3 с кожни Нео). Средните нива на 25ВД при различните групи болни са показани на таблицата по-долу.

Табл. 46. Средни нива на ВД при кожен, некожен и епителоидни Нео спрямо пациенти без Нео, давност на БТ над 12 месеца.

25ВД при пациенти с Нео	25ВД при пациенти без Нео, n=184	P (Mann-Whitney U test)	
Кожни карциноми, n=3	62.33±23.56	53.99±20.55	0.591
Некожни Нео, n=8	42.05±15.12	53.99±20.55	0.108

Всички пациенти с Нео, n=11	47.58±18.99	53.99±20.55	0.277
--------------------------------	-------------	-------------	-------

Отново не се установява статистически значима разлика между пациентите с Нео (всички пациенти с Нео, кожни и некожни Нео) и пациентите без Нео, въпреки че е налице леко увеличаване на разликата във 25ВД при пациентите с некожни Нео и без Нео.

### **6.10.3. Влияние на ВД върху честотата на неоплазии при пациенти с давност на БТ над 36 месеца**

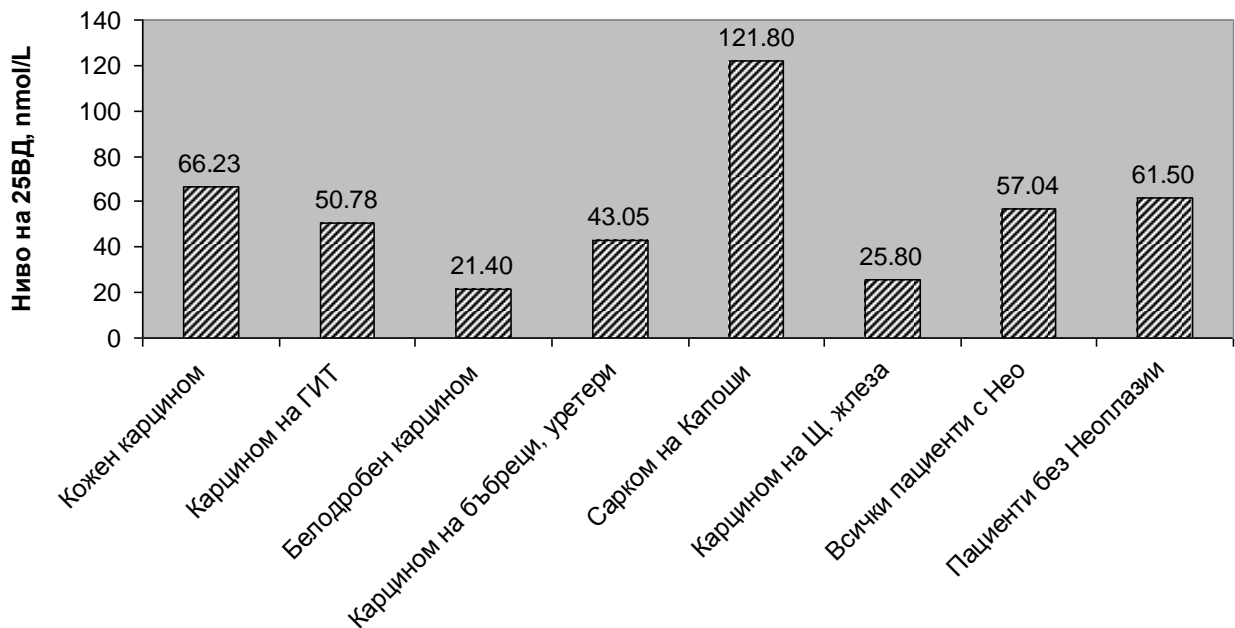
В тази група болни с Нео бяха 15 бъбречнотрансплантирани от общо 223 пациента. Разпределението по вид Нео е показано в таблица 47.

Табл. 47. Неоплазии при пациентите с давност на БТ над 36 месеца.

Вид неоплазия	Брой болни
Кожен карцином	6
Карцином с произход ГИТ	4
Карцином – бял дроб	1
Карцином – отделителна система и бъбреци	2
Карцином – Щитовидна жлеза	1
Сарком на Капоши	1

Нивата на 25ВД според типа на Нео са показани на фигура 42

Фиг. 42. Средни нива на 25ВД според типа на Нео, пациенти с давност на БТ над 36 месеца



След уедняквяване по доказаните предиктори за нивото на 25ВД в тази група бяха селектирани 153 бъбречнотрансплантирани; от тях - 11 с Нео (8 с некожни Нео, 3 – с кожни Нео). Средните стойности на 25ВД в съответните групи болни с Нео и без малигнени заболявания са представени в таблицата по-долу.

Табл. 48. Средни нива на ВД при пациенти с различни видове Нео и без Нео, давност на БТ над 36 месеца

25ВД при пациенти с Нео	25ВД при пациенти без Нео, n=142	P (Mann-Whitney U test)	
Кожни карциноми, n=3	62.33±23.56	55.24±21.16	0.708
Некожни Нео, n=8	42.05±15.12	55.24±21.16	0.078
Всички пациенти с Нео, n=11	47.58±18.99	55.24±21.16	0.194

И в тази група няма статистически значима разлика във ВД статуса при пациенти с и без Нео. Отчита се обаче по-голяма разлика във 25ВД при пациентите с некожни епителoidни Нео и тези без Нео.

#### 6.10.4. Влияние на ВД върху честотата на неоплезии при пациенти с давност на БТ над 60 месеца

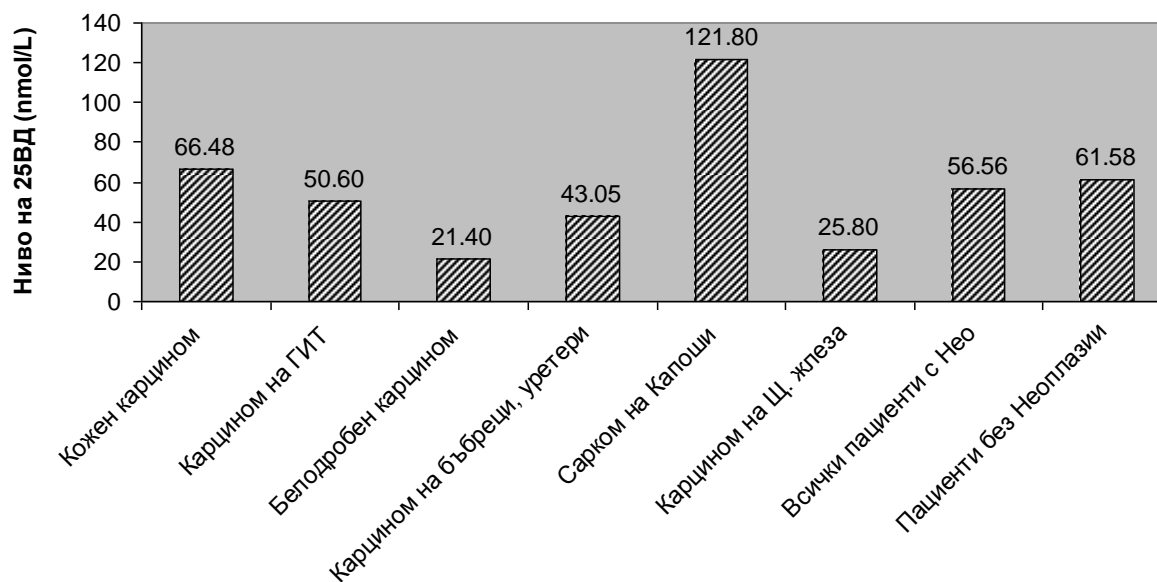
В групата с давност на БТ над 60 месеца бяха селектирани 196 трансплантирани, от които 11 бяха с малигнени Нео. Различните видове Нео са описани в таблицата долу.

Табл. 49. Видове неоплазии при трансплантирани с давност на БТ над 36 месеца

Вид неоплазия	Брой болни
Кожен карцином	4
Карцином с произход ГИТ	2
Карцином – бял дроб	1
Карцином – отделителна система и бъбреци	2
Карцином – Щитовидна жлеза	1
Сарком на Капоши	1

Средните нива на 25ВД при отделните видове Нео са показани на фиг. 43.

Фиг. 43. Средните ива на 25ВД при отделните видове Нео, давност на БТ над 60 месеца



След уеднаквяване на пациентите с и без Нео по значимите фактори, влияещи на 25ВД се селектираха 155 болни, от които 9 бяха с Нео (6 пациента с некожни Нео и 3 с кожни Нео). Средните нива на ВД и статистическата значимост са обобщени в табл. 50. Табл. 50. Средни нива на ВД при пациенти с и без Нео, давност на БТ над 60 месеца.

25ВД при пациенти с Нео	25ВД при пациенти без Нео, n=146	P (Mann-Whitney U test)	
Кожни карциноми, n=3	64.97±21.85	59.11±23.66	0.685
Некожни Нео, n=6	39.08±16.57	59.11±23.66	0.035
Общ брой на пациенти с Нео, n=9	47.71±21.41	59.11±23.66	0.140

Резултатите показват незначима разлика при общата група пациенти с Нео и пациентите с кожни карциноми спрямо тези без малигнени заболявания. В тази група се отчита статистически значимо по-ниско ниво на 25ВД при пациентите с некожни Нео.

#### 6.10.5. Влияние на ВД върху честотата на неоплазии при пациенти с давност на БТ над 120 месеца

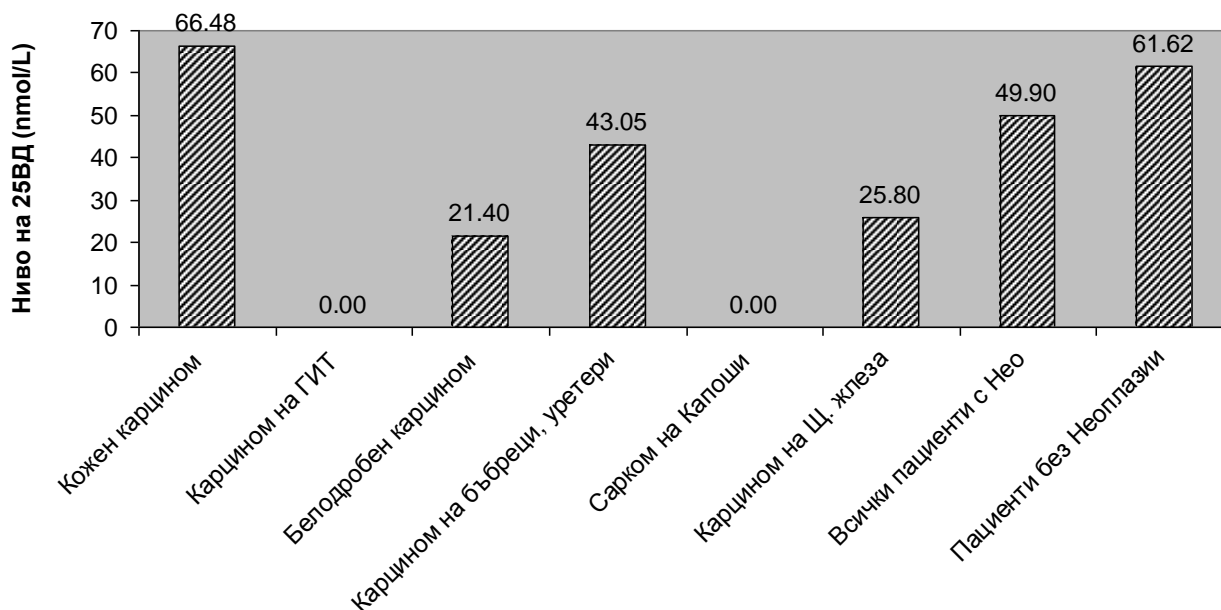
В тази група от общо 89 пациента, общо 8 бяха с Нео. Разпределението им според вида на малигненото заболяване е показано на табл. 51.

Табл. 51. Разпределение на пациентите с Нео според вида на заболяването

Вид неоплазия	Брой болни
Кожен карцином	4
Карцином с произход ГИТ	0
Карцином – бял дроб	1
Карцином – отделителна система и бъбреци	2
Карцином – Щитовидна жлеза	1
Сарком на Капоши	0

Средните стойности на 25ВД според вида Нео са представени на фиг. 44.

Фиг. 44. 25ВД нива при пациентите с Нео



След уеднаквяване на болните по предикторите за нивото на 25ВД се селектираха 87 болни, 8 от които с диагностициран Нео ( 4 с кожни карциноми, 4 с некожни карциноми). Средните нива на ВД във всяка от групите са представени в табл. 52.

Табл. 52. Средни нива на 25ВД на кожни карцином и некожни карциноми, давност на БТ над 120 месеца.

25ВД при пациенти с Нео	25ВД при пациенти без Нео, n=87	P (Mann-Whitney U test)	
Кожни карциноми, n=4	66.48±18.10	60.63±22.62	0.517
Некожни Нео, n=4	33.23±16.74	60.63±22.62	0.020
Всички болни с Нео, n=8	49.90±23.97	60.63±22.62	0.252

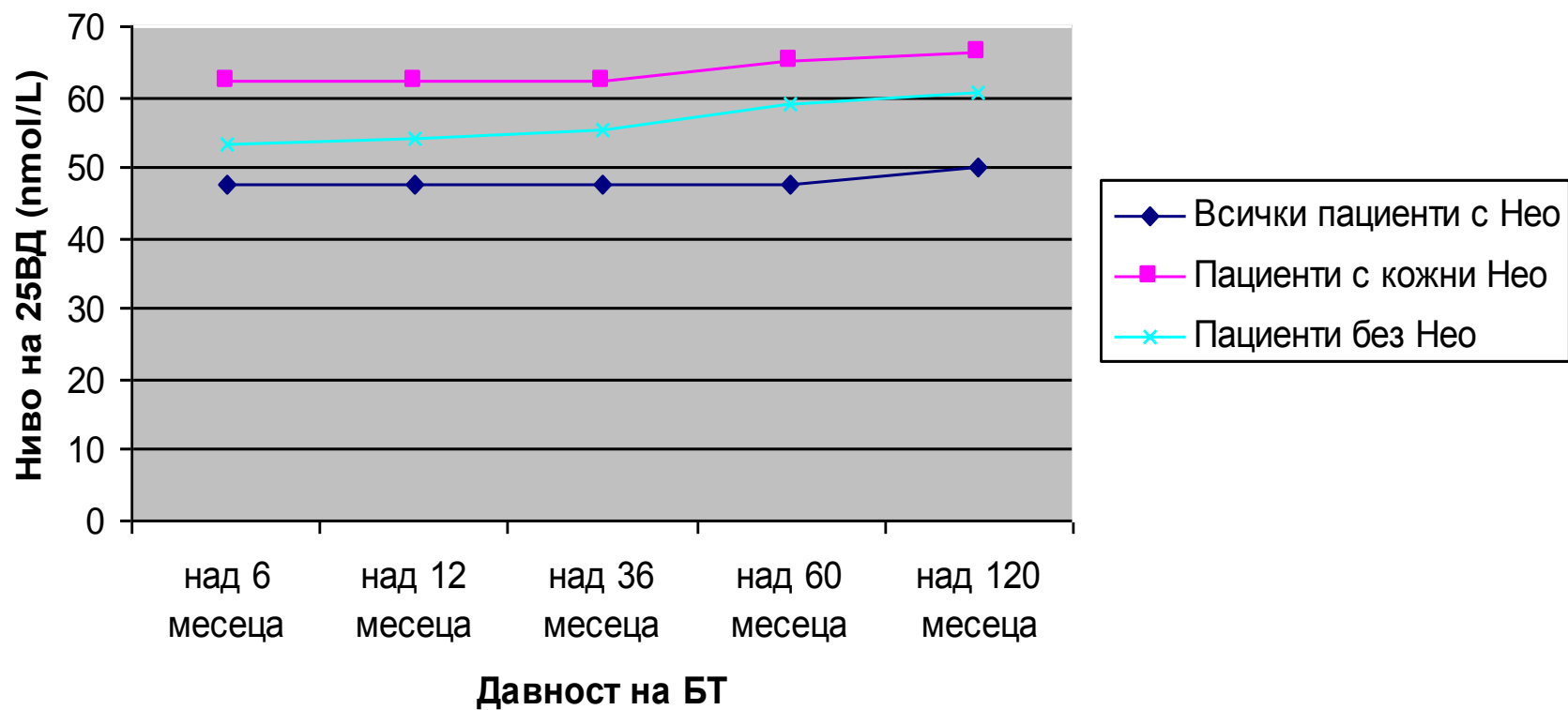
Отново се отчита незначима разлика във ВД между общата група болни с Нео и с кожни карциноми и трансплантираните без Нео. Запазва се тенденцията към увеличаване разликата във 25ВД при пациентите с некожни карциноми спрямо тези без Нео.

### 6.10.6 Заключение

Въз основа на посочените по-горе резултати и след проведения статистически анализ можем да направим следните изводи:

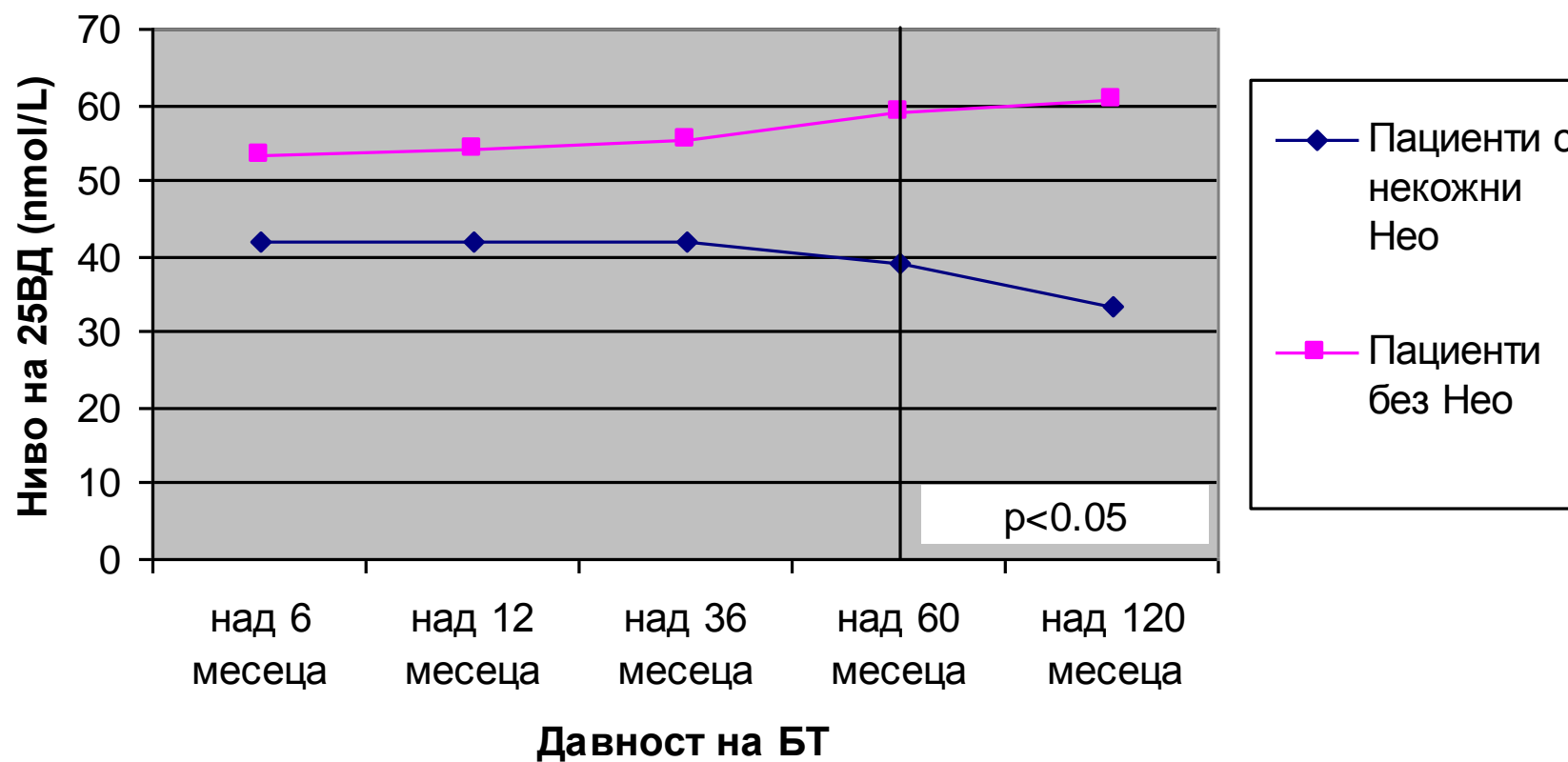
1. При трансплантираните без Нео е налице покачване в стойностите на 25ВД с увеличаване давността на БТ (графика 12).
2. Нивото на 25ВД при всички пациенти с Нео е незначително по-ниско от това на пациентите без Нео, като е налице на увеличаване на разликата с напредване давността на БТ (графика 12). Най-висока разлика се отчита в групите с давност над 60 и 120 месеца.
3. При пациенти с кожни карциноми ( безоцелуларен и спиноцелуларен) се отчитат по-високи нива на 25ВД от пациентите без Нео, като разликата остава статистически незначима във всички групи трансплантирани.
4. При пациентите с епителоидни малигнени тумори се отчитат значимо по-ниски нива на 25ВД след 60<sup>и</sup> месец след БТ. До тогава разликата е статистически незначима. Налице е тенденция към нарастване на разликата в средното ниво на 25ВД при пациенти с некожни карциноми и без Нео с увеличаване давността на БТ (графика 13).
5. Важно е да се отбележи, че интерпретацията на резултатите е ограничена при тези групи болни, при които бройката на пациенти е под 5.

Графика 12. Ниво на ВД при пациентите с кожни карциноми, некожни Нео, всички пациенти с Нео и трансплантираните без Нео при различна давност на БТ



БТ – бъбречна трансплантация, 25ВД – 25 хидроксивитамин Д, Нео - неоплазии

Графика 13. Ниво на ВД при пациентите с некожни карциноми и трансплантирани без Нео



БТ – бъбречна трансплантация, 25ВД – 25 хидроксивитамин Д, Нео - неоплазии

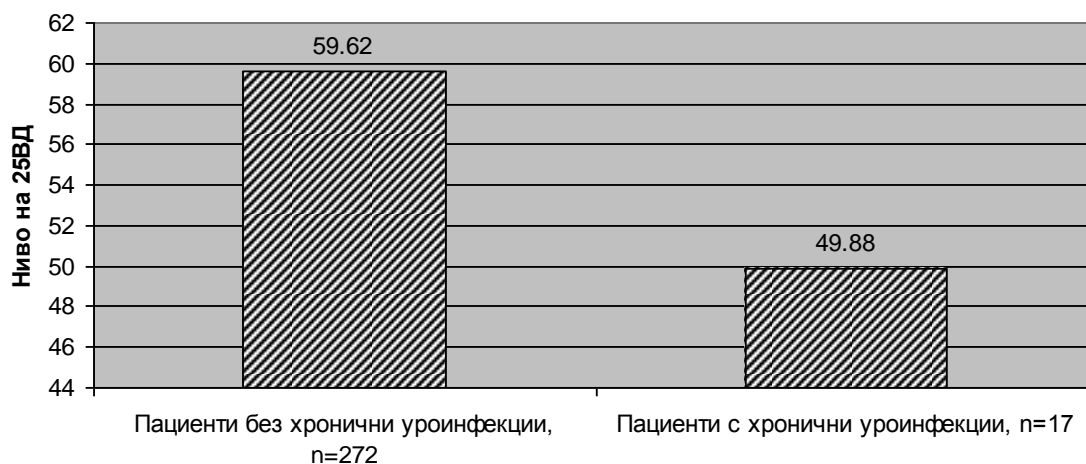
## 6.11. Влияние на ВД върху честотата на уроинфекции след бъбречна трансплантация

Уроинфекциите са една от водещите причини за загуба на трансплантата след БТ. Цел на нашето проучване бе да оценим влиянието на ВД върху честотата на хроничните уроинфекции при пациенти с БТ. Хронична уроинфекция дефинирахме поне 3 епизода на активни уроинфекции, установена 12 месеца преди и след изследването за 25ВД. С оглед на сравнително малкият брой болни с хронични уроинфекции при така селектираните болни (максимален брой 17), отново регресионният анализ бе неприложим за статистически анализ. Използвахме U теста на Mann-Whitney, след уеднаквяване на групите с и без уроинфекции по факторите, влияещи на 25ВД. Аналогично на предходните глави бяха разгледани пациентите с различна давност на БТ (след 6, 12, 36, 60 и 120 месеца).

### 6.11.1. Влияние на ВД върху честотата на хронични уроинфекции при пациенти с давност на БТ над 6 месеца

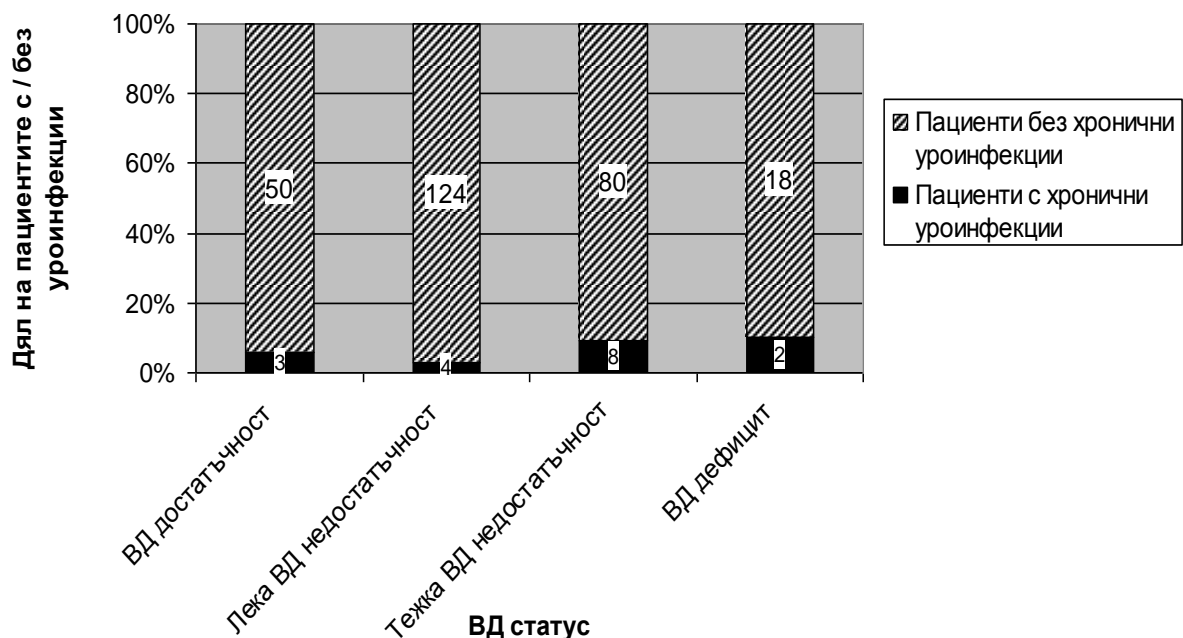
В тази група трансплантирани с общ брой 289 пациента, 17 бяха с данни за хронични уроинфекции. Средното ниво на 25ВД при пациентите без уроинфекции е 59.62 nmol/L, а на тези с уроинфекции е 49.88 nmol/L (фиг. 45)

Фиг. 45. Средни нива на 25ВД при пациенти с и без уроинфекции в общата група трансплантирани с БТ над 6 месеца



Обследвахме и разпределението на пациентите с уроинфекции според ВД статуса - резултатът е обобщен във фигура 46.

Фиг. 46. Разпределение на пациентите според ВД статуса



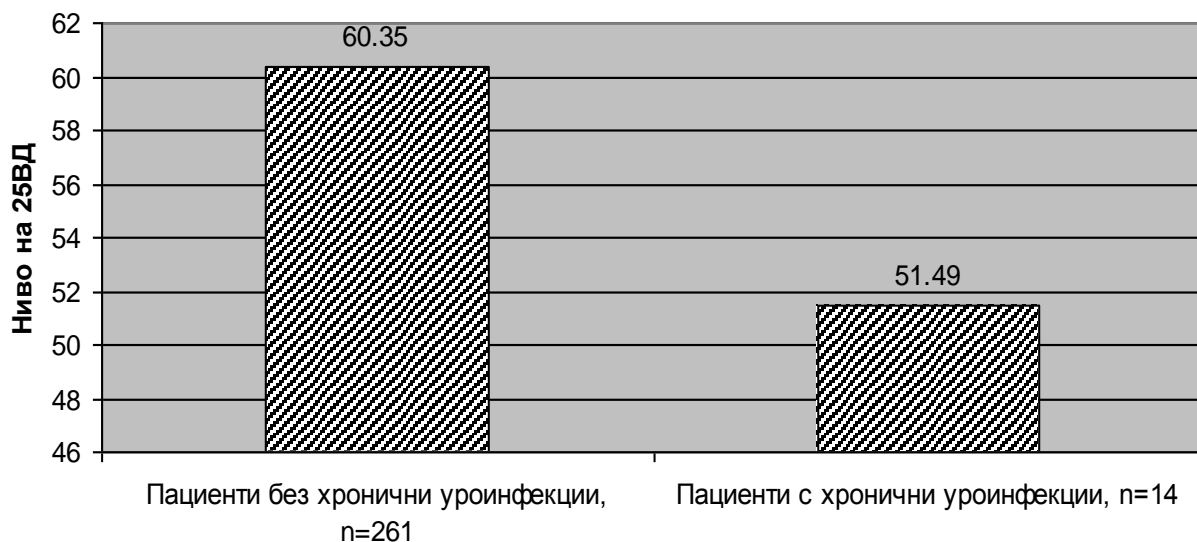
Отчита се по-висок относителен дял на пациентите с хронични уроинфекции при пациентите с по-лош ВД статус.

За оценка на статистическата значимост на разликата между пациентите с и без уроинфекции болните бяха уеднаквени по факторите, влияещи на 25ВД. По този начин се селектираха 181 болни, от които 14 бяха с уроинфекции. Средното ниво на 25ВД при пациентите без уроинфекции (УроИ) беше  $52.79 \pm 18.65$  nmol/L; при пациентите с УроИ –  $47.68 \pm 19.50$  nmol/L. Разликата не беше статистически значима ( $p=0.231$ ).

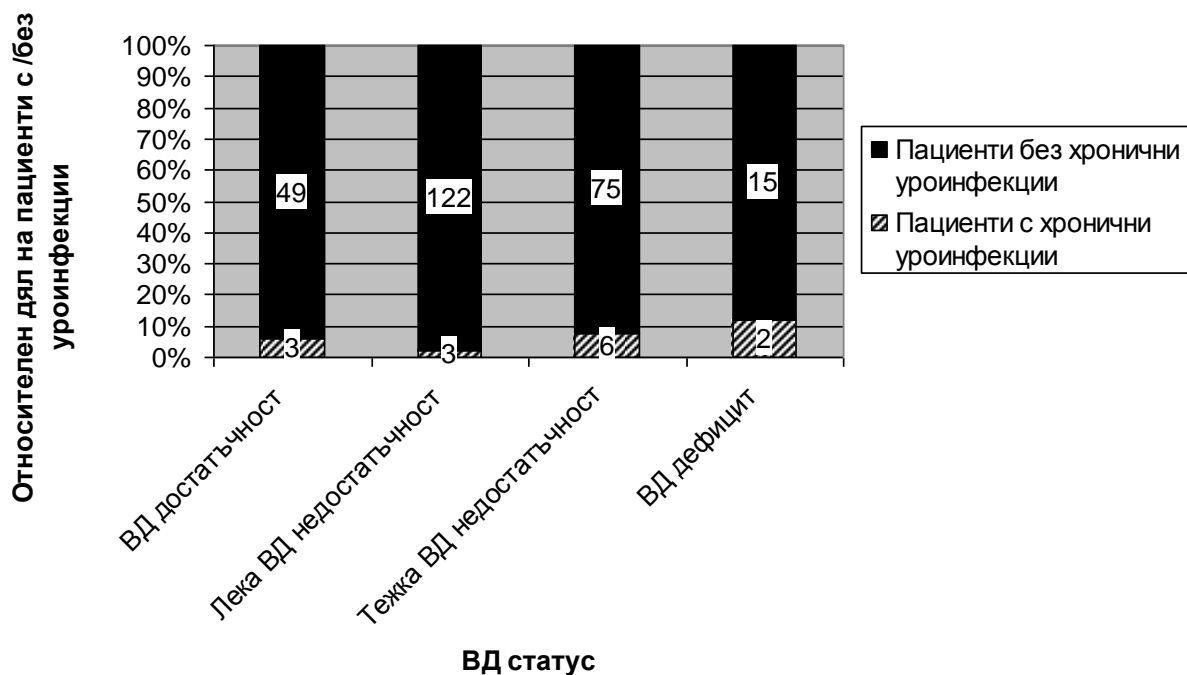
### 6.11.2. Влияние на ВД върху честотата на хронични уроинфекции при пациенти с давност на БТ над 12 месеца

В тази група бяха селектирани 275 бъбречнотрансплантирани, от които 14 бяха с УроИ. Средните стойности на пациентите с и без УроИ, както и разпределението им според ВД статуса са обобщени във фигури 47 и 48.

Фиг. 47. Средни стойности на 25ВД при пациентите с и без уроинфекции, давност на БТ над 12 месеца



Фиг. 48. Разпределение на пациентите спрямо ВД статуса, БТ с давност над 12 месеца



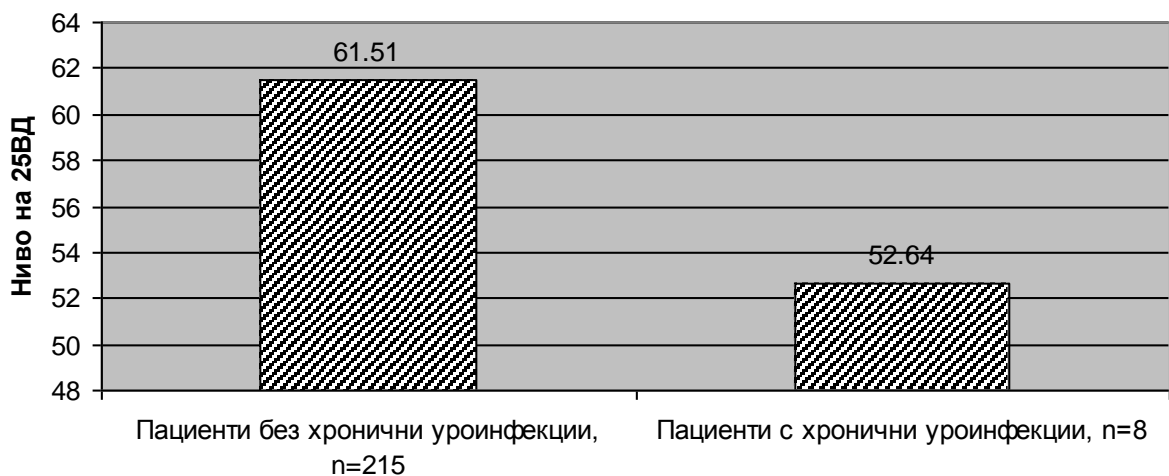
Аналогично на предходната група се отчита по-голям относителен дял на пациентите с УроИ в групите с по-лош ВД статус (тежса ВД недостатъчност и ВД дефицит). За оценка на статистическата значимост между групите с и без уроинфекции уеднаквихме двете групи по факторите, влияещи на нивото на 25ВД. По този начин се селектираха 169 бъбречнотрансплантирани, 11 от които са с УроИ. Средното ниво на 25ВД

беше  $53.30 \pm 18.37$  nmol/L при пациентите без УроИ и  $49.08 \pm 21.04$  nmol/L, при пациентите с хронични уроинфекции, което беше отново статистически незначимо ( $p=0.342$ ).

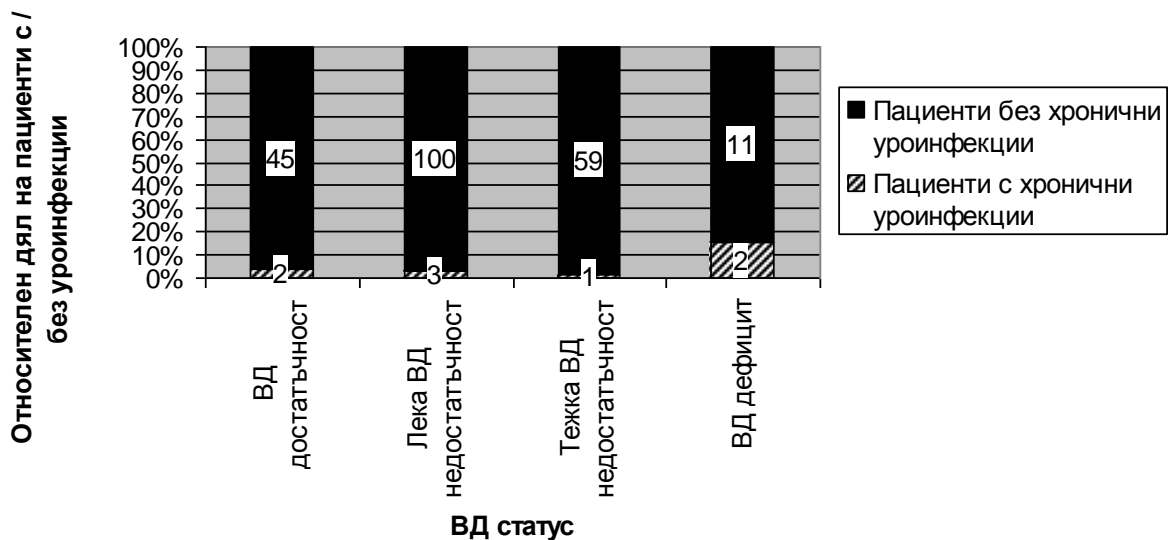
### 6.11.3. Влияние на ВД върху честотата на хронични уроинфекции при пациенти с давност на БТ над 36 месеца

В тази група трансплантирани попаднаха 223 пациента, 8 от които бяха с хронични уроинфекции. Разликата в средното ниво на 25ВД и разпределението на пациентите според ВД статуса е показано на фиг. 49 и 50.

Фиг. 49. Средни нива на 25ВД при пациенти с и без уроинфекции, БТ с давност над 36 месеца



Фиг. 50. Разпределение на болните според ВД статуса



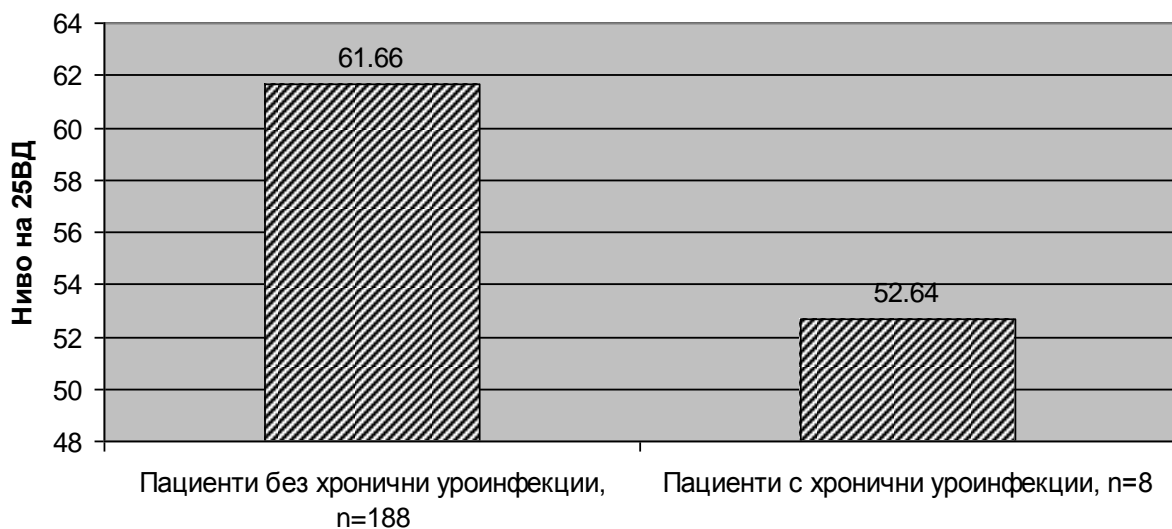
Най-висок относителен дял на пациенти с УроИ се отчита при пациенти с ВД дефицит, а в групата с тежка ВД недостатъчност се отчите спад на дела пациенти с УроИ. Запазва се ниският дял на тези пациенти при леките нарушения на ВД статуса и ВД достатъчност. Трябва да се отбележи и малкият брой болни в някои групи.

За оценка на статитическата разлика уеднаквихме двете групи болни по факторите, влияещи на 25ВД. По този начин селектирахме 56 пациента, 5 от които бяха с хронични уроинфекции .Средното ниво на 25ВД при пациентите без инфекции беше  $48.25 \pm 18.19 \text{ nmol/L}$ , а при тези с уроинфекции –  $48.24 \pm 26.26 \text{ nmol/L}$ . Разликата е статистически незначима ( $p=0.978$ ).

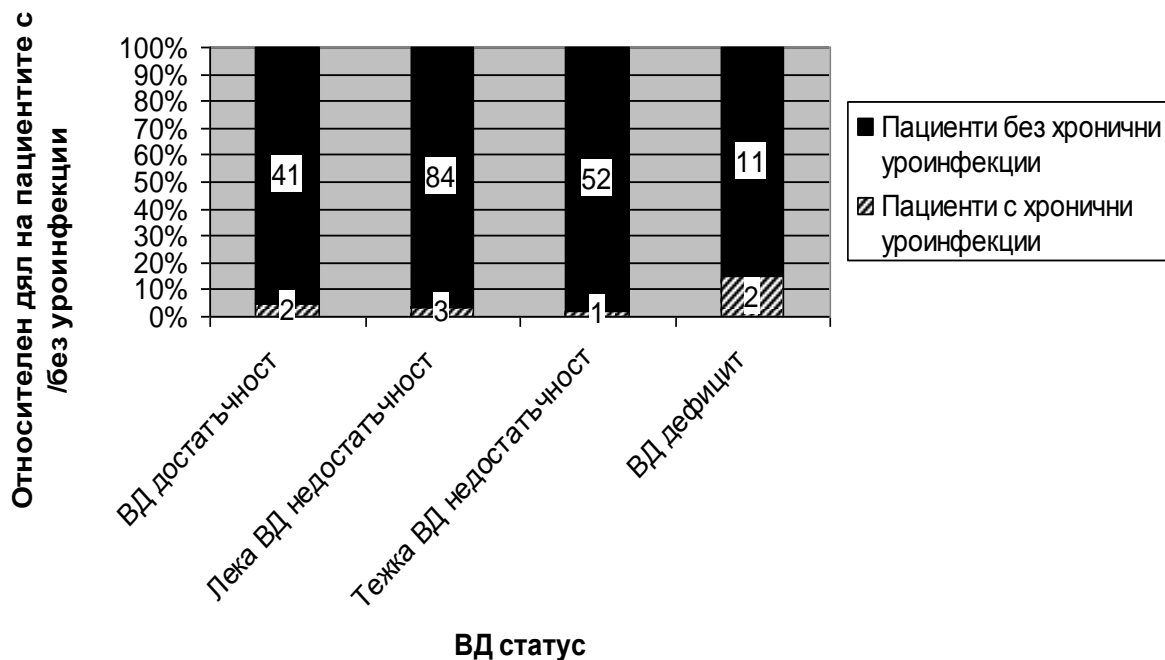
#### 6.11.4. Влияние на ВД върху честотата на хронични уроинфекции при пациенти с давност на БТ над 60 месеца

В тази група трансплантирани ( $n=196$ ) 8 бяха с хронични уроинфекции. Средните нива на 25ВД и разпределението според ВД статуса на пациентите с и без инфекции са показани на на фиг. 51и фиг. 52.

Фиг. 51. Средни нива на 25ВД при пациенти с и без уроинфекции, давност на БТ над 60 месеца



Фиг. 52. Разпределение на пациентите според ВД статуса, давност на БТ над 60 месеца.



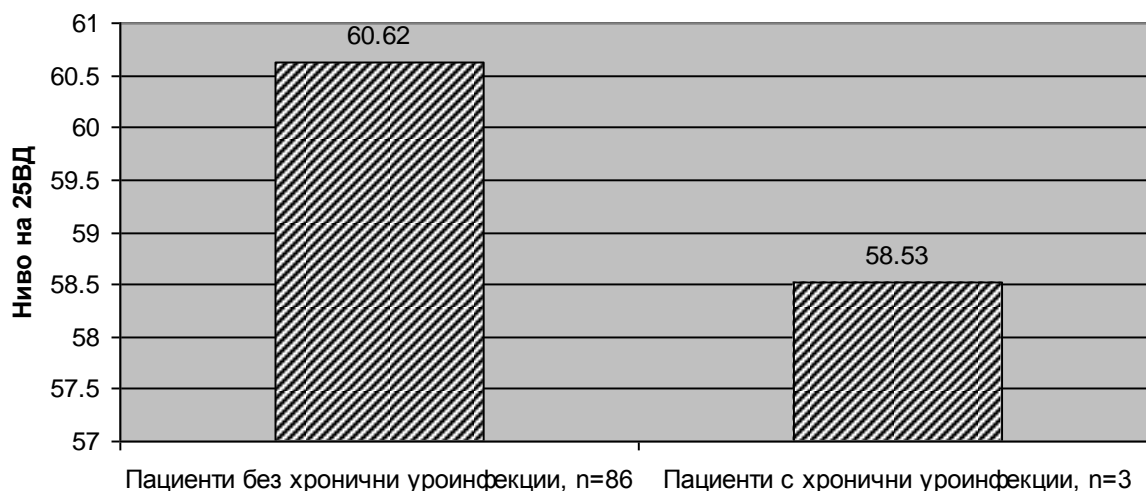
Отново най-висок относителен дял на пациенти с УроИ се отчита при пациентите с ВД дефицит, а най-нисък – при тези с ВД достатъчност и лека недостатъчност.

За оценка на статистическата разлика между 25ВД при пациентите с и без уроинфекции уеднаквихме двете групи болни по доказаните предиктори на ВД статуса в тази група. Селектираха се 51 болни, 5 от които бяха с хронични уроинфекции. Средното ниво на 25ВД беше съответно  $47.22 \pm 18.73 \text{ nmol/L}$  за пациентите без уроинфекции и  $48.24 \pm 26.26 \text{ nmol/L}$  за пациентите с уроинфекции. Разликата беше статистически незначима ( $p=0.949$ ).

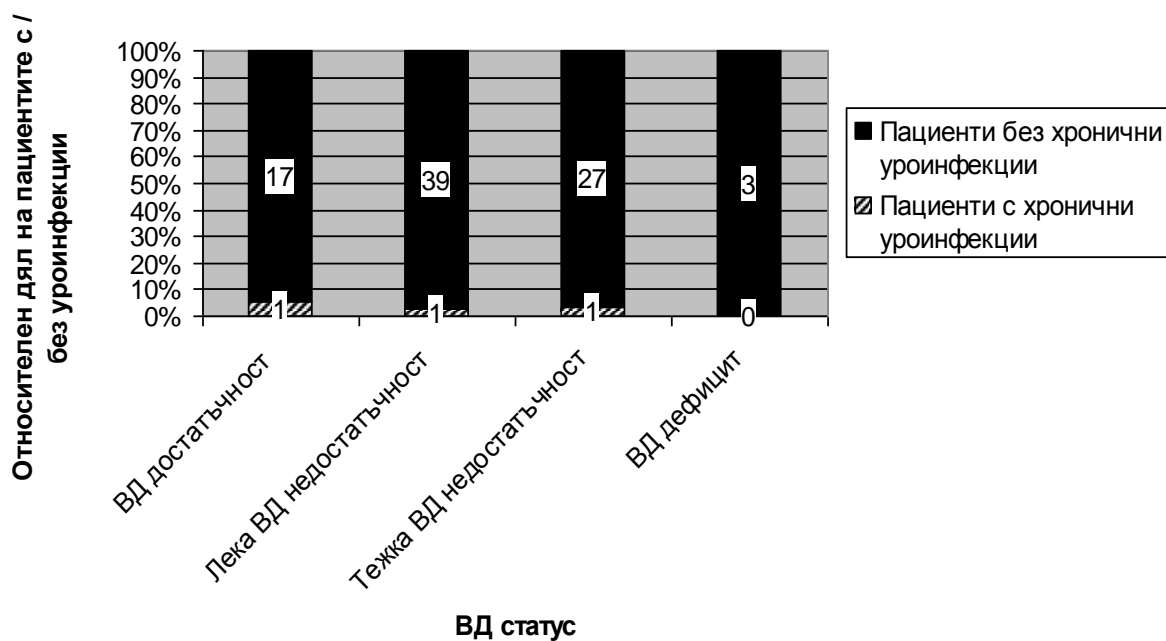
#### 6.11.5. Влияние на ВД върху честотата на хронични уроинфекции при пациенти с давност на БТ над 120 месеца

В тази група болни ( $n=89$ ) 3 бяха с хронични уроинфекции. Средните нива на 25ВД и разпределението според ВД статуса е показано на фиг. 53 и фиг. 54.

Фиг. 53. Средни нива на 25ВД при пациенти с и без уроинфекции, БТ над 120 месеца



Фиг. 54. Разпределение на пациентите според ВД статуса, БТ над 120 месеца



За разлика от другите разглеждани групи, в тази не се отчитат болни с УроИ и ВД дефицит. Трябва да се отбележи и малкият брой болни в тази подгрупа (n=3). В останалите подгрупи според ВД статуса резултатите са сходни на предходните, но отново се отчитат малък брой болни с УроИ – по 1 във всяка група.

Болните отново бяха уеднаквени по факторите, влияещи на 25ВД в групата с давност над 120 месеца. Бяха селектирани 26 болни, 3 от които бяха с хронични уроин-

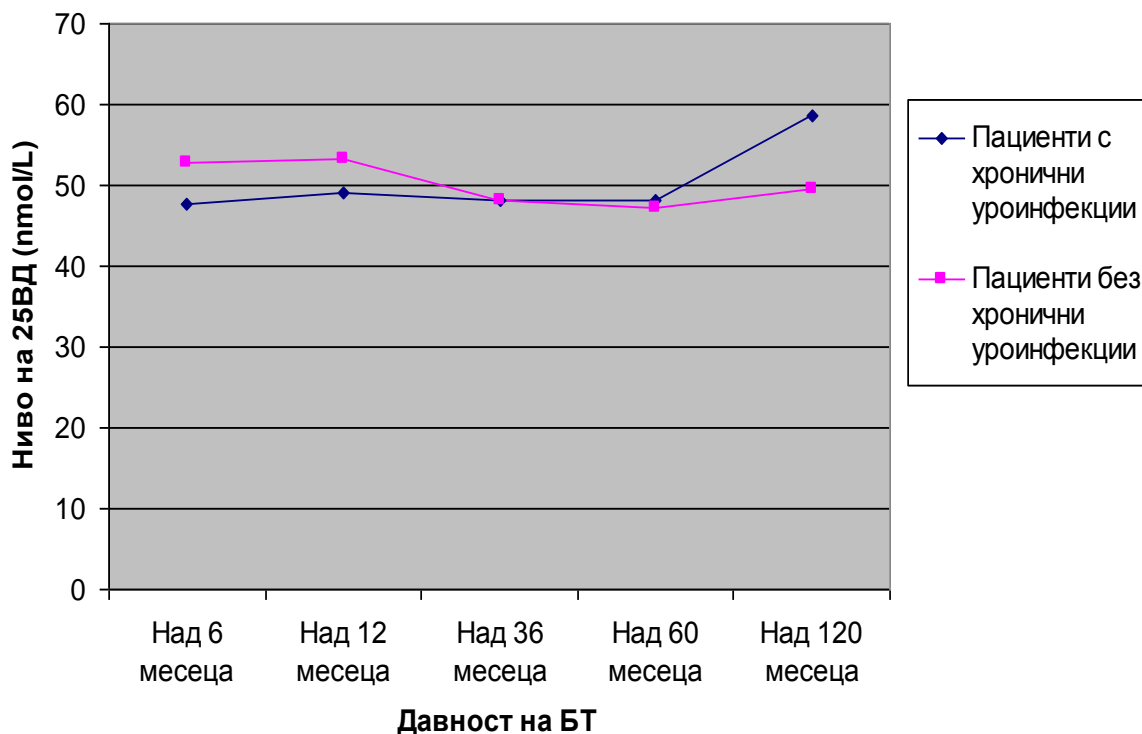
фекции. Средното ниво на 25ВД беше  $49.61 \pm 24.06$  nmol/L за пациентите без уроинфекции и  $58.53 \pm 29.20$  nmol/L за пациентите с уроинфекции. Разликата беше статистически незначима ( $p=0.748$ ).

### 6.11.6. Заключение

Въз основа на представените данни можем да направим следните заключения:

1. Нивото на 25ВД при пациентите без уроинфекции е в диапазона 48 – 55 nmol/L, докато това на пациентите с уроинфекции е в рамките на 48 – 50 nmol/L, с изключение на пациентите с давност над 120 месеца ( $58.53 \pm 29.20$  nmol/L, вж графика 14). Разликите остават статистически незначими при всички групи трансплантирани
2. Налице е тенденция към покачване на 25ВД при пациентите с уроинфекции спрямо тези без уроинфекции, като разликата е най-добре изразена при пациентите с давност на БТ над 120 месеца.
3. Тълкуването на данните е ограничено при групите с брой пациенти под 5.

Графика 14. Средни ВД нива при пациентите с различна давност на БТ.



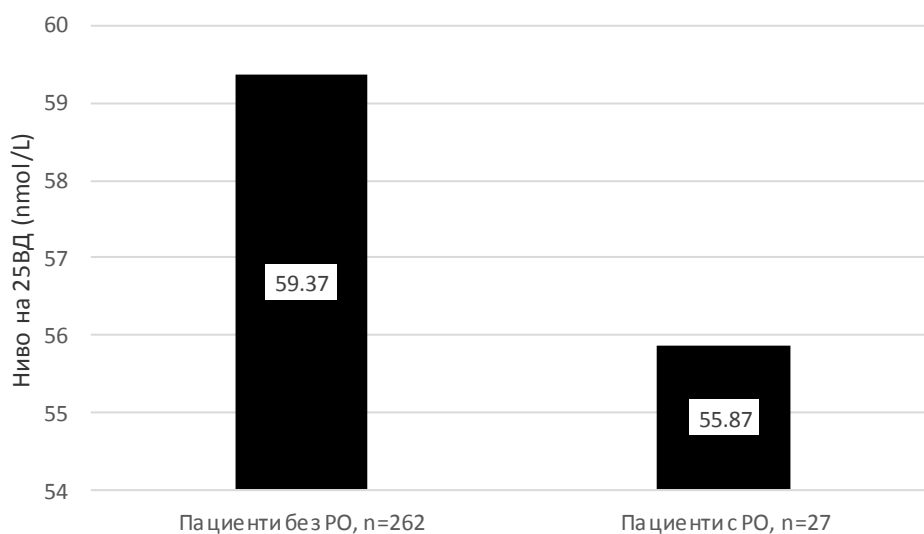
## 6.12. Влияние на ВД върху честотата на реакциите на отхвърляне след БТ

Алоимунните реакции са едно от най-честите усложнения след БТ, както и една от честите причини за загуба на трансплантата. Ето защо една от целите на разработката ни бе да оценим влиянието на ВД статуса върху честотата на реакциите на отхвърляне (РО). РО се дефинира наличие на доказана с пункционна бъбречна биопсия или наличие на антидонорни анти HLA антитела при селектираните пациенти 12 преди и 12 месеца след изследването за 25ВД. Аналогично на предходните раздели (6.10 и 6.11) поради малкият брой пациенти с РО за статистическа обработка на данните използвахме U теста на Mann – Whitney, с уеднаквяване на групите болни по доказаните предиктори за нивото на ВД.

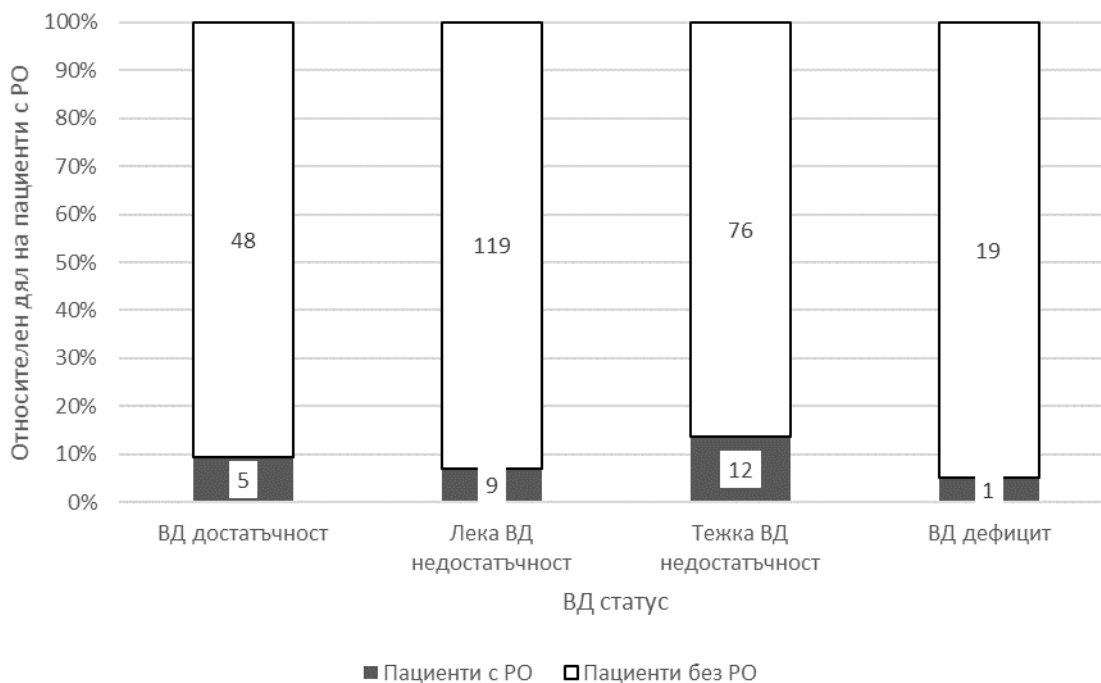
### 6.12.1. Влияние на ВД върху честотата на РО при пациентите с давност на БТ над 6 месеца

В тази група трансплантирани (n=289) 27 бяха с диагностицирана РО. Средните нива на 25ВД в групата с и без РО, както и разпределението на пациентите според ВД статуса са представени на фиг. 55 и 56.

Фиг. 55. Средни нива на 25ВД при пациентите с и без РО, давност на БТ над 6 месеца



Фиг. 56. Разпределение на пациентите по ВД статус, БТ над 6 месеца



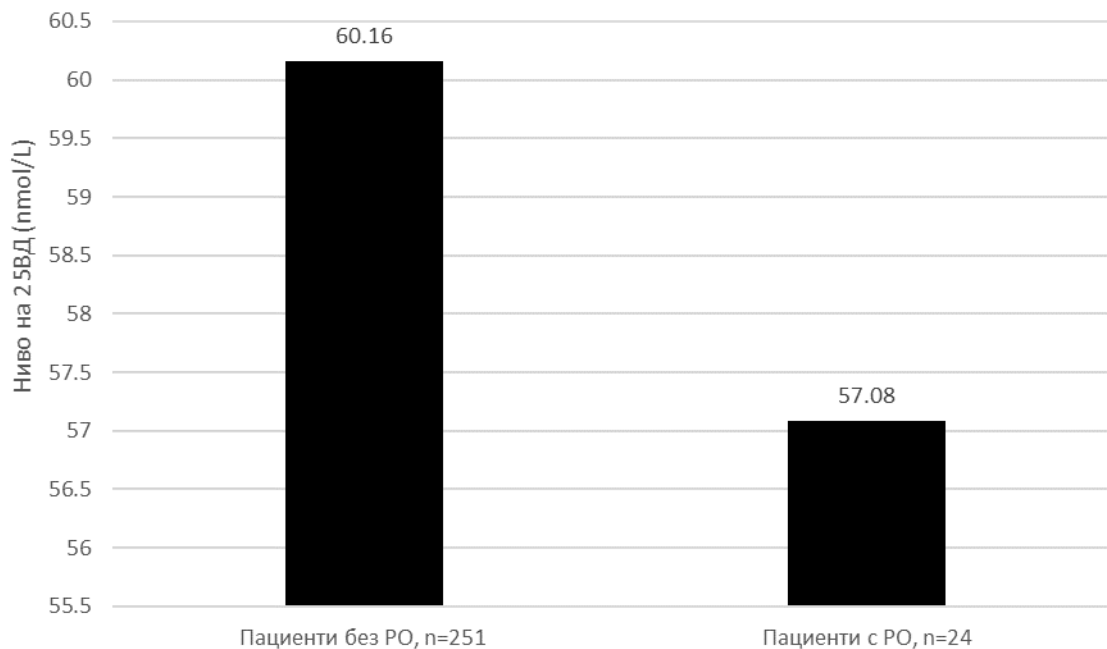
Отчита се по-високо ниво на 25ВД при пациентите без РО, без двете групи да са уеднаквени по факторите, влияещи на 25ВД. Най-висок относителен дял на пациенти с РО се отчита при трансплантираните с тежка ВД недостатъчност.

За да оценим статистически разликата между нивата на 25ВД при пациенти с и без РО, уеднаквихме двете групи по предикторите на ВД статуса в групата с давност на БТ над 6 месеца. По този начин селектирахме общо 228 трансплантирани, 20 от които бяха с доказани РО. Средното ниво на 25ВД в групата с РО беше  $46.53 \pm 18.05$  nmol/L, в групата без РО –  $54.29 \pm 20.26$  nmol/L, като разликата беше статистически незначима ( $p=0.064$ ).

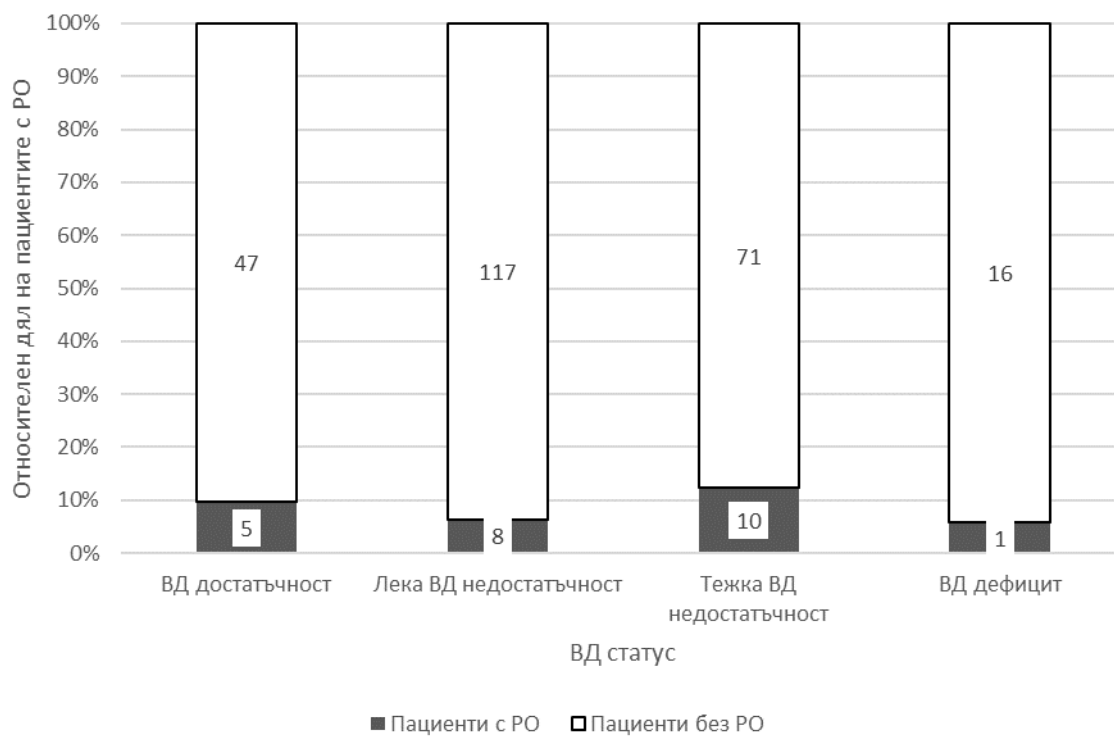
### 6.12.2. Влияние на ВД върху честотата на РО при пациентите с давност на БТ над 12 месеца

В групата болни с давност на БТ над 12 месеца ( $n=275$ ) 24 бяха с диагностицирана РО. Средните нива на 25ВД при пациентите с и без РО, както и разпределението на пациентите според ВД статуса са обобщени във фигури 57 и 58.

Фиг. 57. Средни нива на 25ВД при пациентите с и без РО, давност на БТ над 12 месеца



Фиг. 58. Разпределение на пациентите според ВД статуса, БТ над 12 месеца



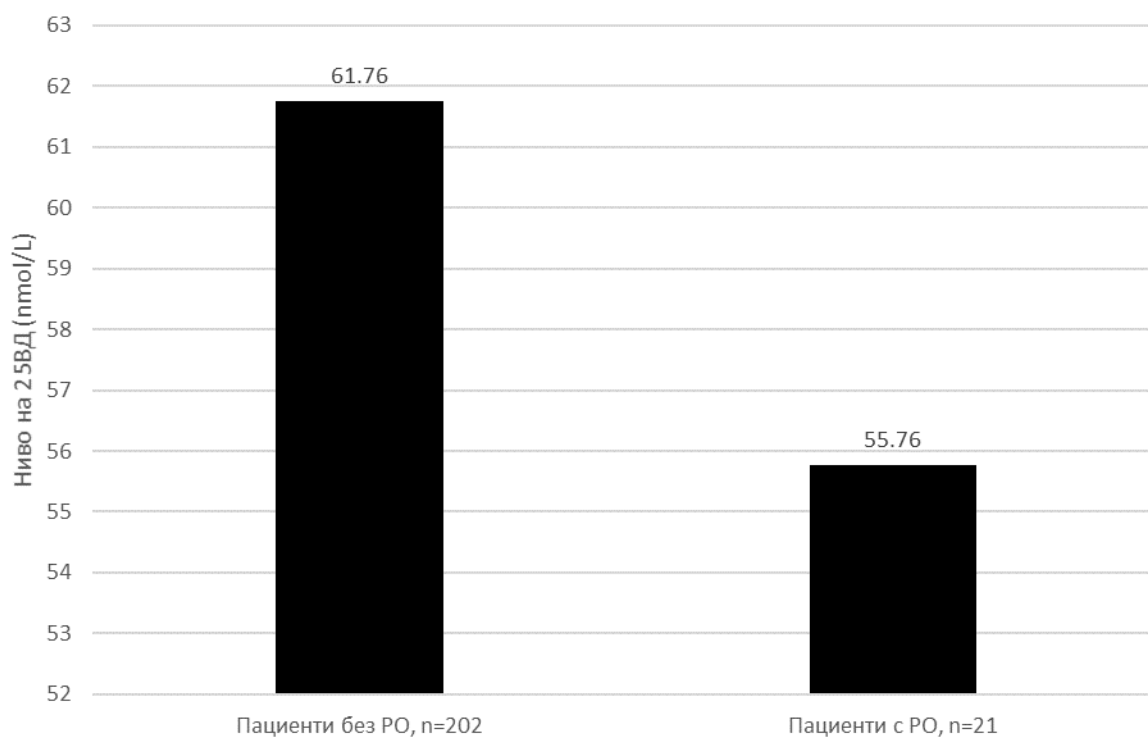
Отново в общата група пациенти (n=275) средното ниво на 25VD е по-високо при трансплантираните без РО. Относителният дял на болните с РО е най-висок в групата с тежка ВД недостатъчност, аналогично на раздел 6.12.1.

След уеднаквяване на двете групи трансплантирани (с и без РО) по факторите, влияещи на 25ВД, се селектираха 210 пациента, 13 от които бяха с РО. Нивото на 25ВД при пациентите без РО беше  $55.01 \pm 20.03$ , докато на тези с РО -  $39.11 \pm 19.99$  nmol/L. Разликата беше статистически значима –  $p=0.003$ .

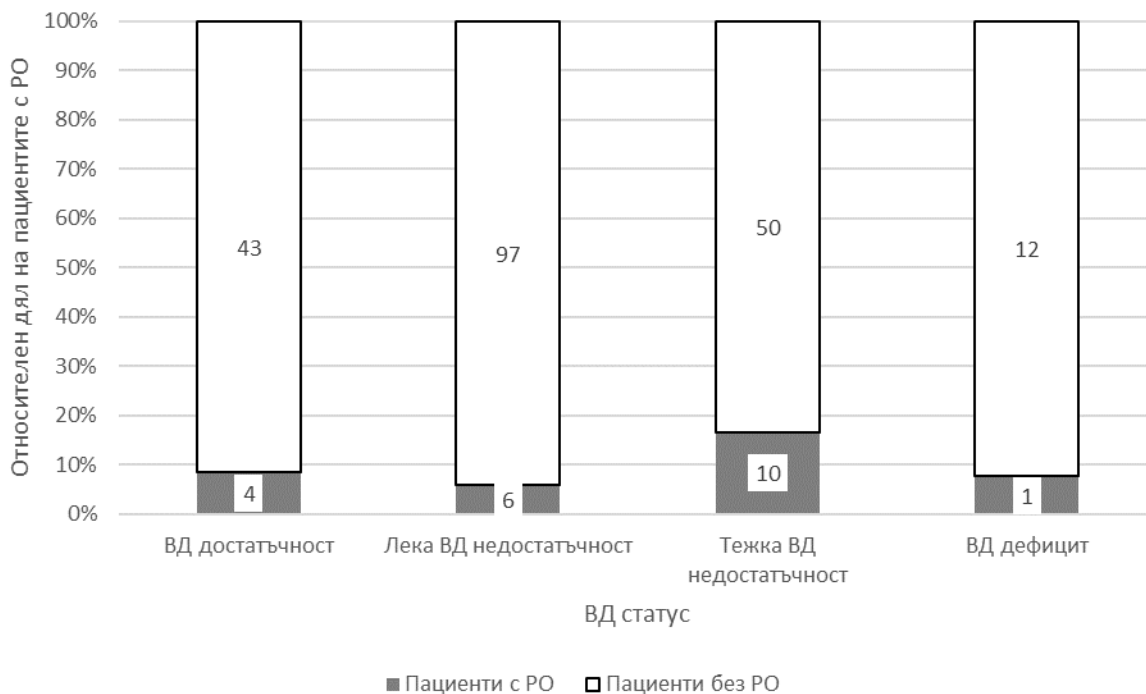
### 6.12.3. Влияние на ВД върху честотата на РО при пациентите с давност на БТ над 36 месеца

21 от общо 223 пациента с давност на БТ над 36 месеца, селектирани по началните изисквания от глава 5.1.1. бяха с РО. Отново разгледахме средните стойности на ВД при пациентите с и без РО, както и разпределението на болните според ВД статуса – резултатите да обобщени във фигури 59 и 60.

Фиг. 59. Средни нива на 25ВД при пациенти с и без РО, БТ над 36 месеца



Фиг. 60. Относителен дял на пациентите с РО според ВД статуса, БТ над 36 месеца



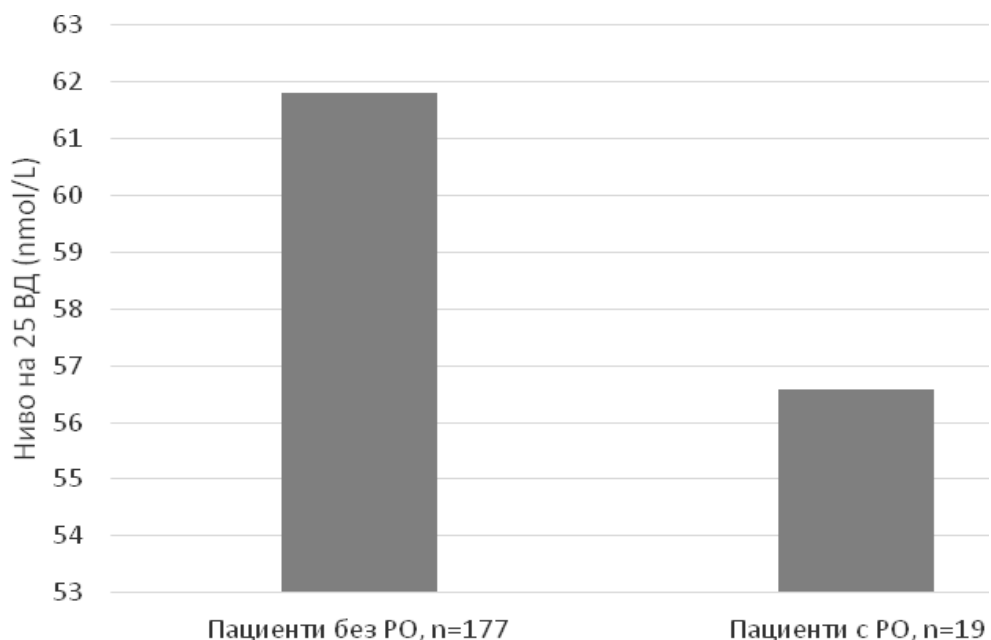
Аналогично на предходните раздели, пациентите с РО имат по-ниско средно ниво на 25ВД и са с най-висок относителен дял при пациентите с тежка ВД недостатъчност.

След уеднаквяване на пациентите по значимите фактори, влияещи на ВД статуса, селектирахме 148 пациента, 11 от които с РО. Средното ниво на 25ВД в групата без РО беше  $54.41 \pm 19.16$ , а това при трансплантираните с РО -  $35.91 \pm 10.02$  nmol/L, като се установи статистически значима разлика –  $p=0.001$ .

#### 6.12.4. Влияние на ВД върху честотата на РО при пациентите с давност на БТ над 60 месеца

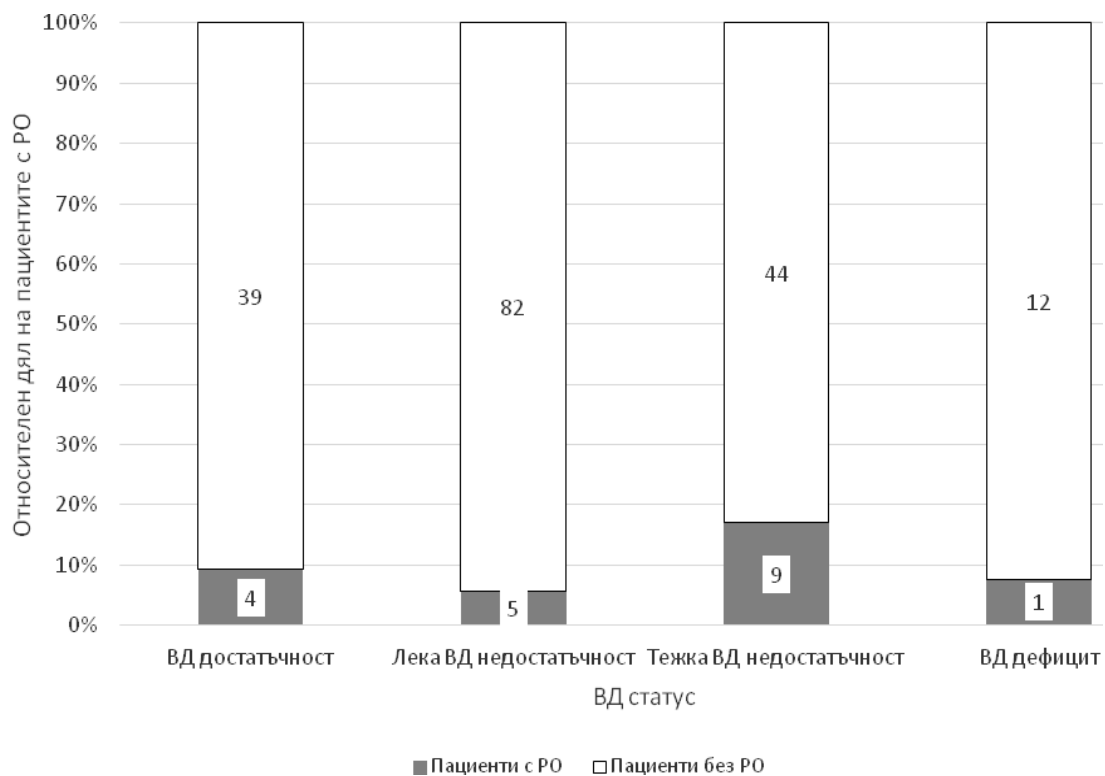
В тази група ( $n=196$ ) бъбречнотрансплантирани 19 бяха с доказана РО, като отново средното нивон на 25ВД при пациентите с РО беше по-ниско от това на пациентите без алоимунна реакция (фиг. 61).

Фиг. 61. Средни нива на 25ВД при пациенти с и без РО, давност на БТ над 36 месеца



Относителният дял на пациентите с РО и давност на БТ над 36 месеца е най-висок при пациентите с тежка ВД недостатъчност, а най-ниска - при пациентите с лека недостатъчност и ВД дефицит (фиг. 62).

Фиг. 62. Разпределение на пациентите с РО според ВД статуса, БТ над 36 месеца

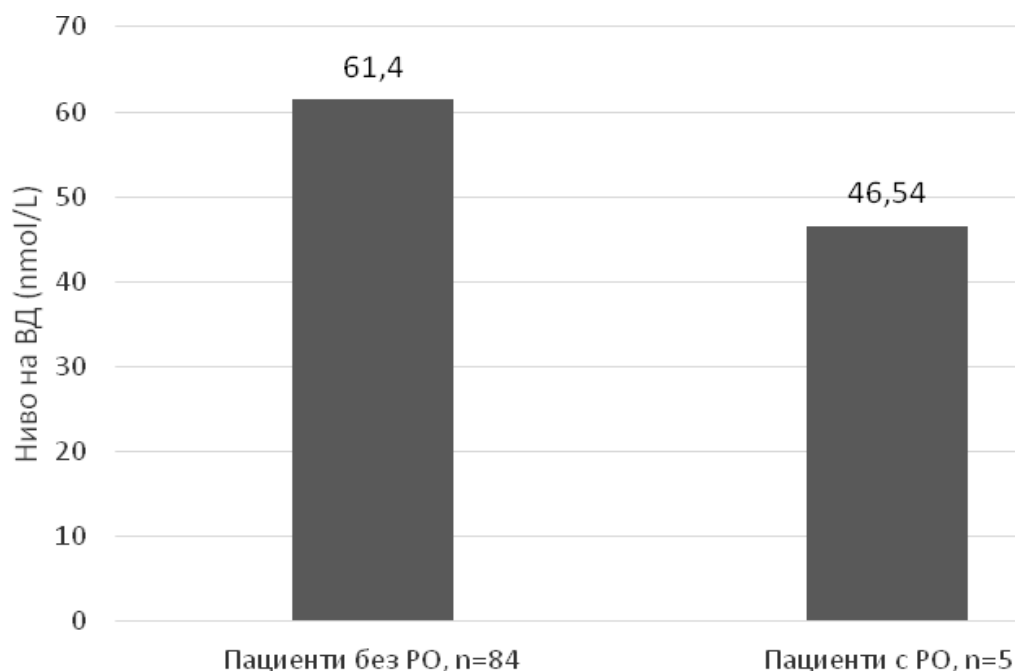


За оценка на статистическата разлика в нивото на 25ВД в двете групи трансплантирани, пациентите бяха уеднаквени по предикторите за 25ВД. Бяха селектирани 125 пациента, 10 от които бяха с РО. 25ВД при пациентите с РО беше  $36.66 \pm 10.23$  nmol/L, при пациентите без РО беше  $53.60 \pm 19.81$  nmol/L, разликата отново беше значима -  $p=0.004$ .

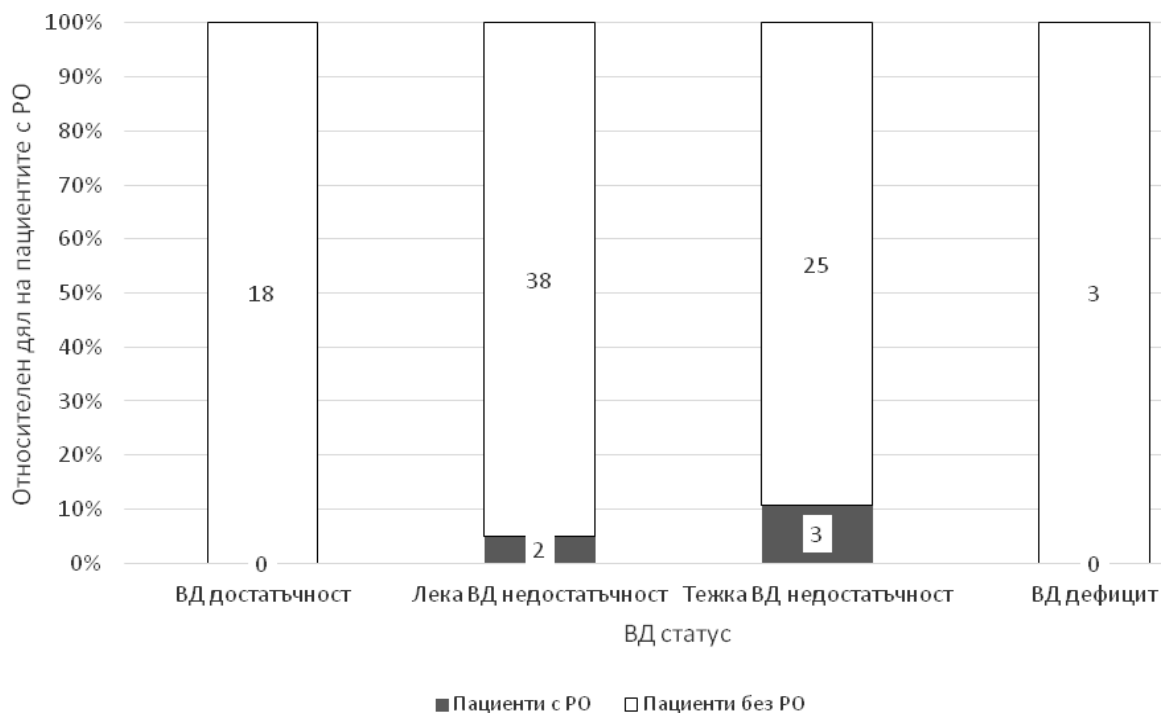
#### **6.12.5. Влияние на ВД върху честотата на РО при пациентите с давност на БТ над 120 месеца**

В групата с най-голяма давност на БТ се изолираха 89 пациента, 5 от които бяха с РО. В общата група трансплантирани с давност на БТ над 120 месеца пациентите с РО бяха с по-ниско средно ниво на 25ВД (фиг. 63). Най-висок дял на пациенти с РО отново се отчита в групата с тежък ВД дефицит, но трябва да се отбележи малкият брой болни с РО (фиг. 64).

Фиг. 63. Средно ниво на 25ВД при пациенти с и без РО, давност на Б над 120 месеца



Фиг. 64. Разпределение на пациентите с РО според ВД статуса, БТ над 120 месеца



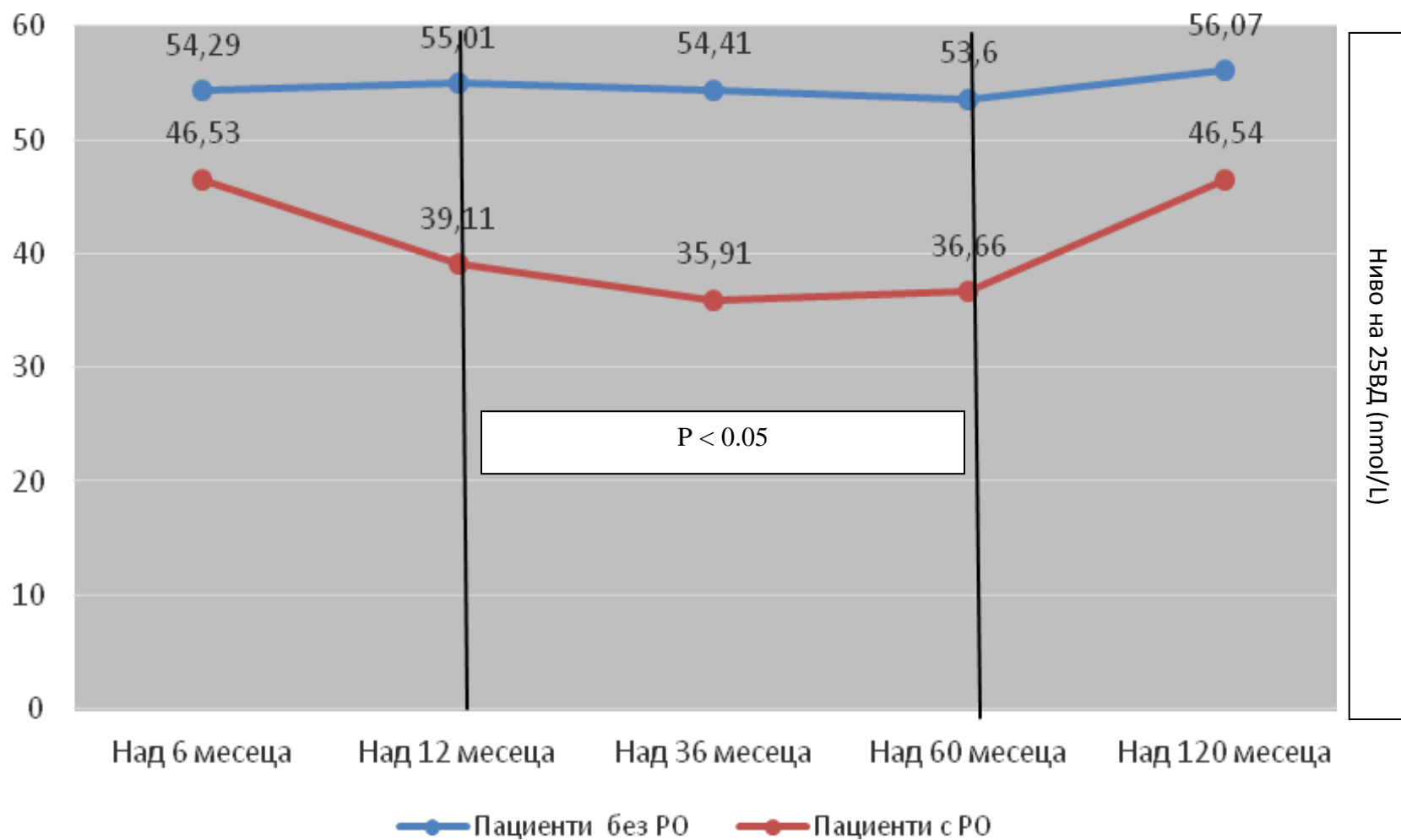
Болните бяха уеднаквени по предикторите за 25ВД; селектираха се 74 трансплантирани, 5 от които бяха с РО. Средното ниво на 25 ВД при трансплантираните без РО беше  $56.07 \pm 20.15$  nmol/L, при тези с РО -  $46.54 \pm 15.95$  nmol/L. Разликата беше статистически незначима ( $p=0.388$ ).

### 6.12.6. Заключение

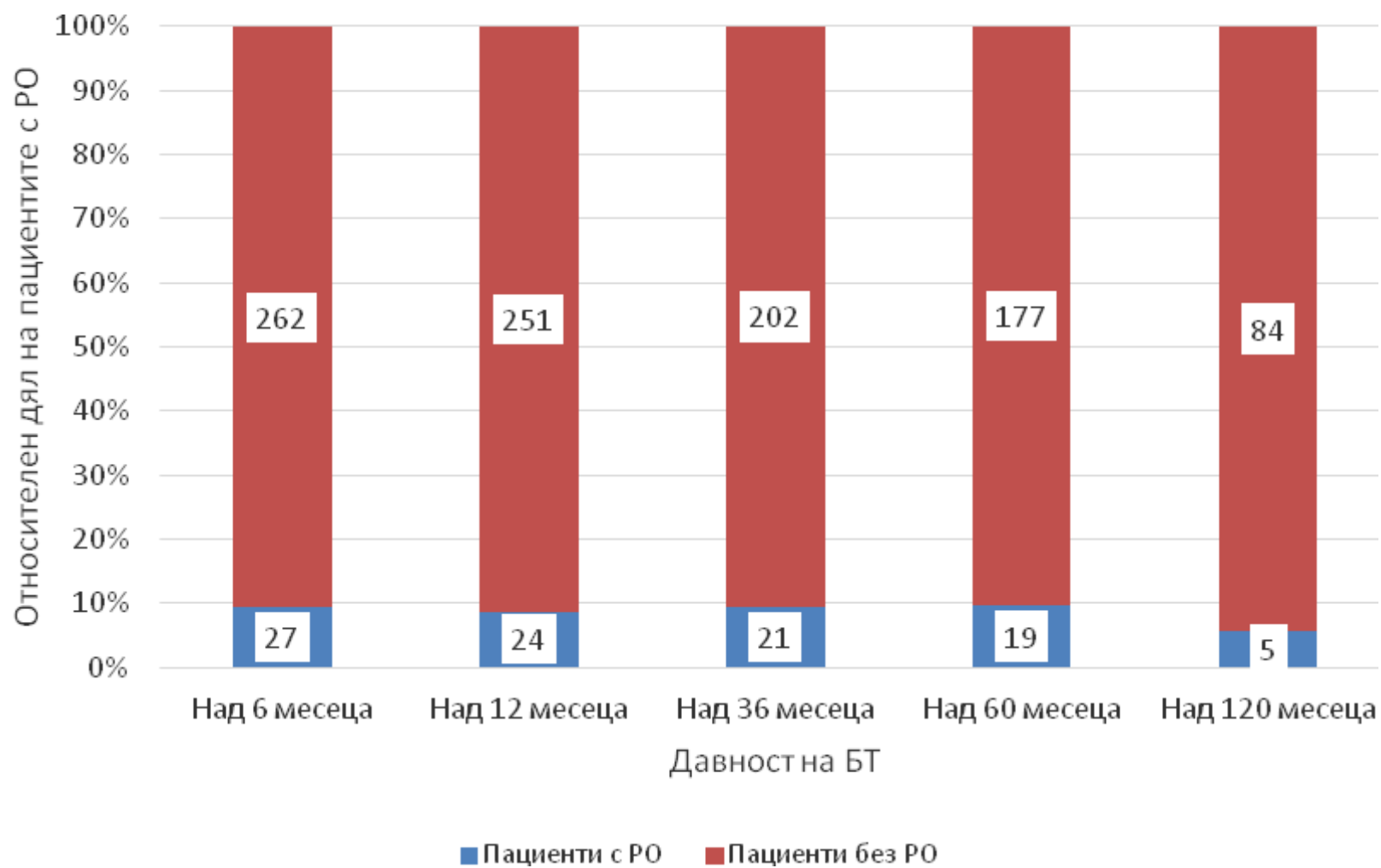
Изложените по-горе данни ни позволяват да направим следните изводи за връзката между VД статуса и честотата на РО:

1. Средното ниво на 25ВД е по-високо при бъбречнотрансплантираните без РО при всички групи според давността на БТ.
2. След уеднаквяване на групите с и без РО по предикторите за 25ВД отново VД статуса на пациентите без РО е по-добър. Разликата е статистически значима при пациентите с давност на БТ над 12, 36 и 60 месеца (графика 15).
3. Разликата във VД е най-малка в групата с давност над 120 месеца. В тази група се отбелязва обаче и най-нисък относителен дял на пациентите с РО (графика 16).

Графика 15. Разлика във ВД при пациентите с различна давност на БТ



Графика 16. Относителен дял на пациентите с РО при различна давност на БТ



### **6.13. Влияние на ВД върху общата смъртност след бъбречна трансплантация**

Общата смъртност (ОС) е един от най-важните медицински показатели при всички групи болни. Основна причина за смърт при пациентите след БТ са съдови инциденти, инфекции, малигнени заболявания. За оценка на връзката между ВД статуса и общата смъртност включихме всички починали пациенти в рамките на 12 месеца след изследването на 25ВД. Поради сравнително малкият брой болни отново регресионният анализ не беше приложим; за оценка на статистическата връзка използвахме Mann-Whitney U test. Разгледахме общият брой на починалите пациенти във всяка група според давността на БТ, поради което броя на починалите намалява с напредване на давността на БТ.

#### **6.13.1. Влияние на ВД върху ОС при пациентите с давност на БТ над 6 месеца**

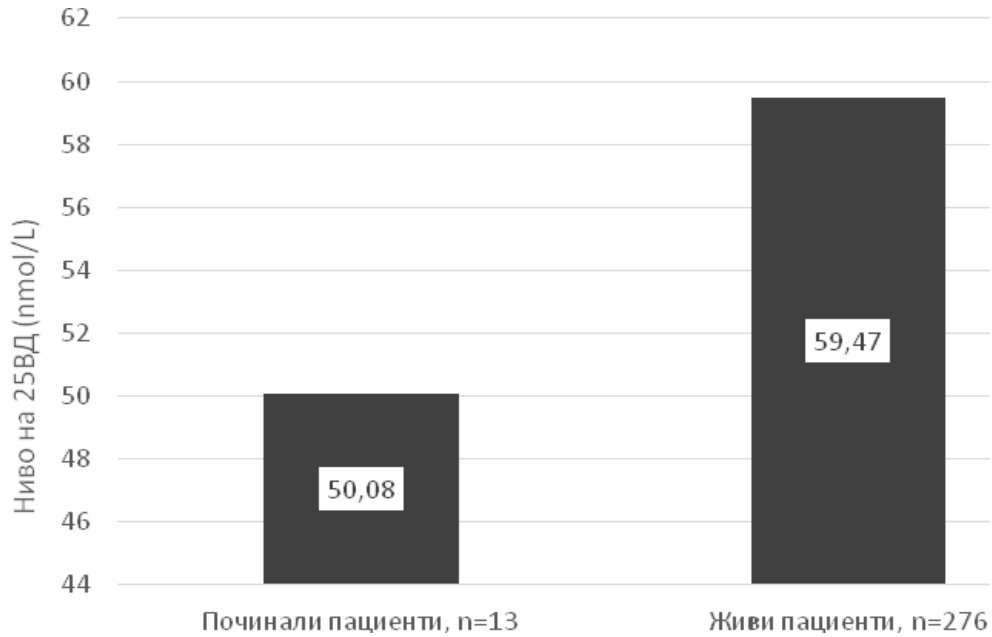
В групата с давност на БТ над 6 месеца, починалите са 13 човека. Причините за мърт са обобщени в таблицата по-долу.

Табл. 53. Причини за смърт при пациентите с давност на БТ над 6 месеца

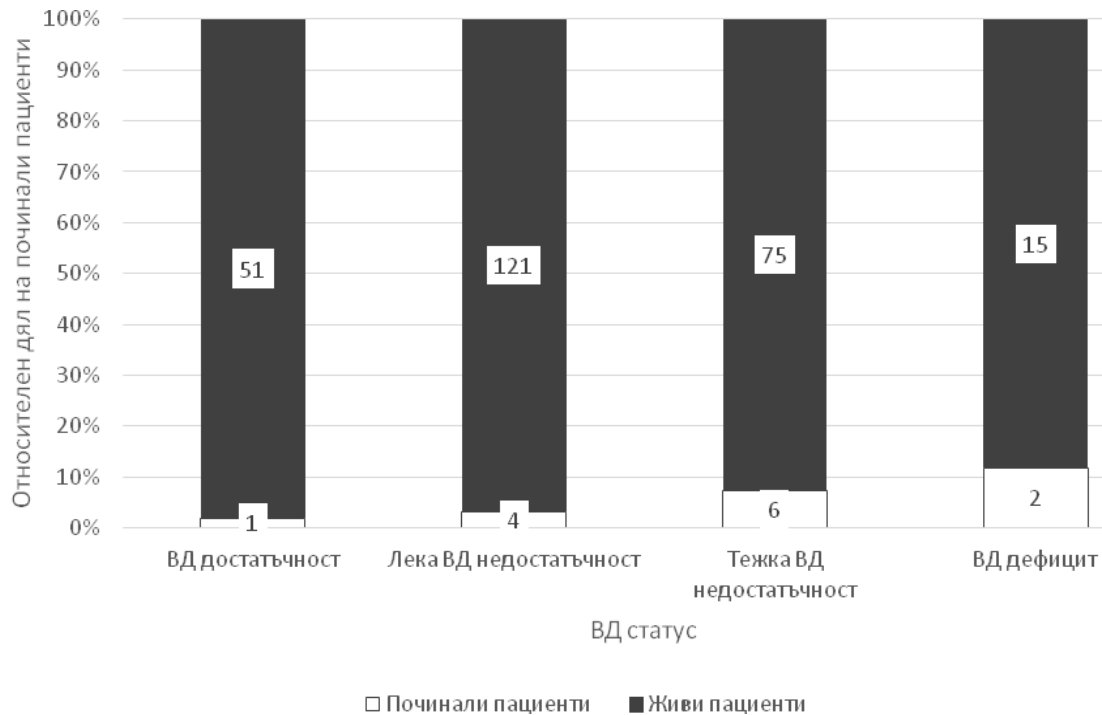
Причина	Брой болни
Съдов инцидент	1
Неоплазии	4
Инфекции	2
Неустановена причина	6

Установи се по-ниско ниво на 25ВД при починалите пациенти, в сравнение с живите (фиг. 65). Относителният дял на починалите болни беше най-висок при тежките отклонения във ВД статуса - тежка ВД недостатъчност и ВД дефицит (фиг. 66).

Фиг. 65. Средно ниво на починалите и живите пациенти, давност на БТ над 6 месеца



Фиг. 66. Относителен дял на починалите пациенти според ВД статуса, БТ над 6 месеца



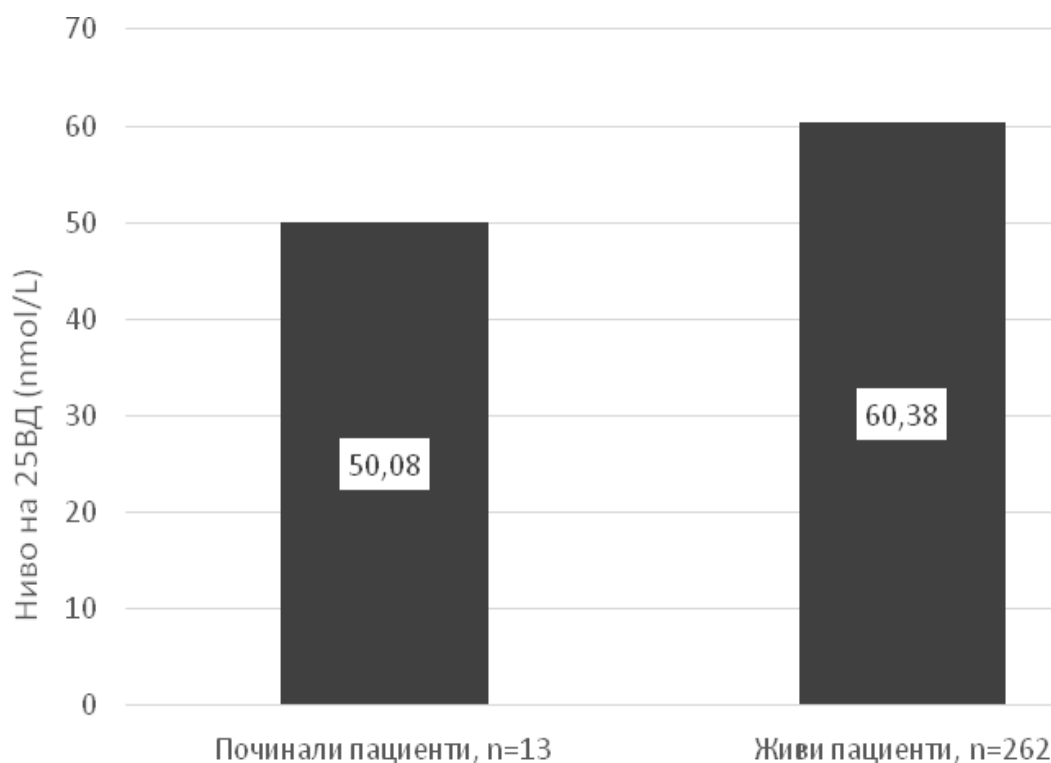
За оценка на статистическата разлика във ВД при починалите и живите пациенти уеднаквихме двете групи по факторите, влияещи ва 25VD. Селектирани бяха 127 пациента, 9 от които бяха починали. Средното ниво на живите пациенти беше

56.69±18.05 nmol/L, а при починалите - 35.81±13.26 nmol/L. Разликата беше статистически значима (p=0.001).

### 6.13.2. Влияние на ВД върху ОС при пациентите с давност на БТ над 12 месеца

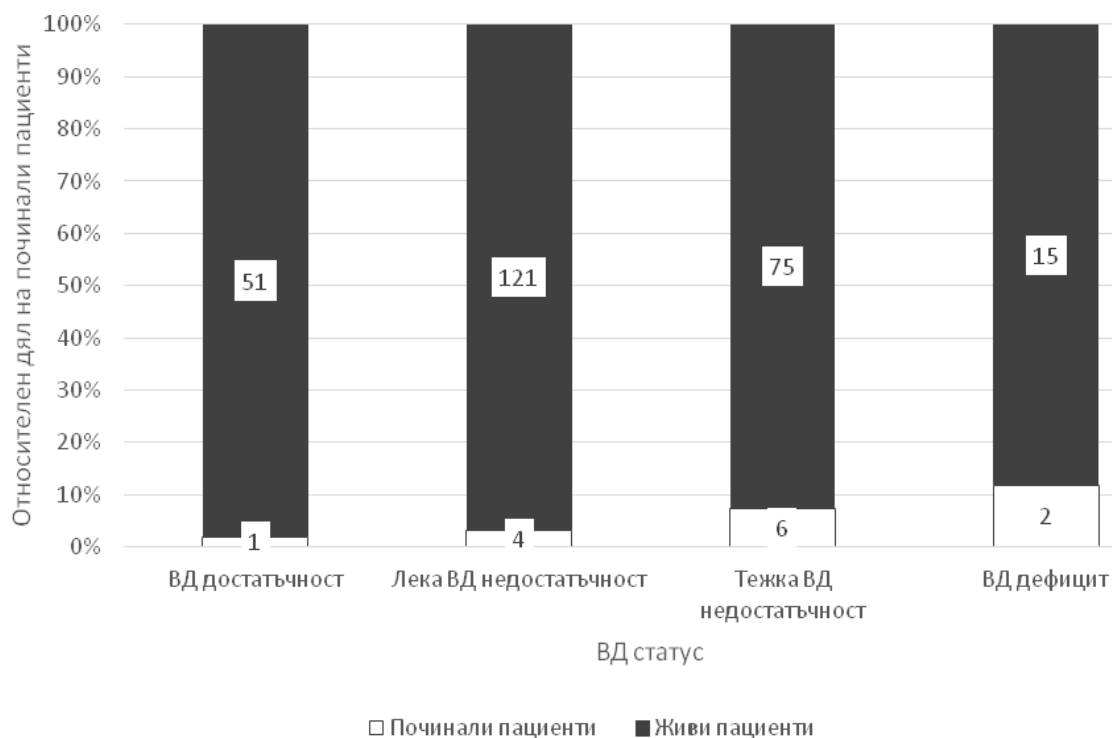
От общо 275 болни, починалите отново бяха 13, като причините за смърт бяха същите като в таблица 49. Средното ниво на 25ВД при починалите пациенти беше отново 50.08±28.30 nmol/L, но нивото на ВД при живите пациенти е малко по - високо (60.38±23.11 nmol/L). Разликата в средните нива е обобщена във фигура 67.

Фиг. 67. Средни нива при починали и живи пациенти, БТ над 12 месеца



Аналогично на болните с давност на БТ над 6 месеца, и в тази група по-лошият ВД статус се свързва с по-голяма обща смъртност, като относителният дял е най-висок при пациентите с ВД дефицит (фиг. 68).

Фиг. 68. Относителен дял на починалите пациенти според ВД статуса, БТ над 12 месеца



След уеднаквяване на болните по предикторите на ВД се селектираха 120 болни, 9 от които бяха починали. Средното ниво при живите болни беше  $57.56 \pm 17.92$  nmol/L, при починалите -  $35.81 \pm 13.26$  nmol/L; разликата отново беше статистически значима ( $p < 0.001$ ).

### 6.13.3. Влияние на ВД върху ОС при пациентите с давност на БТ над 36 месеца

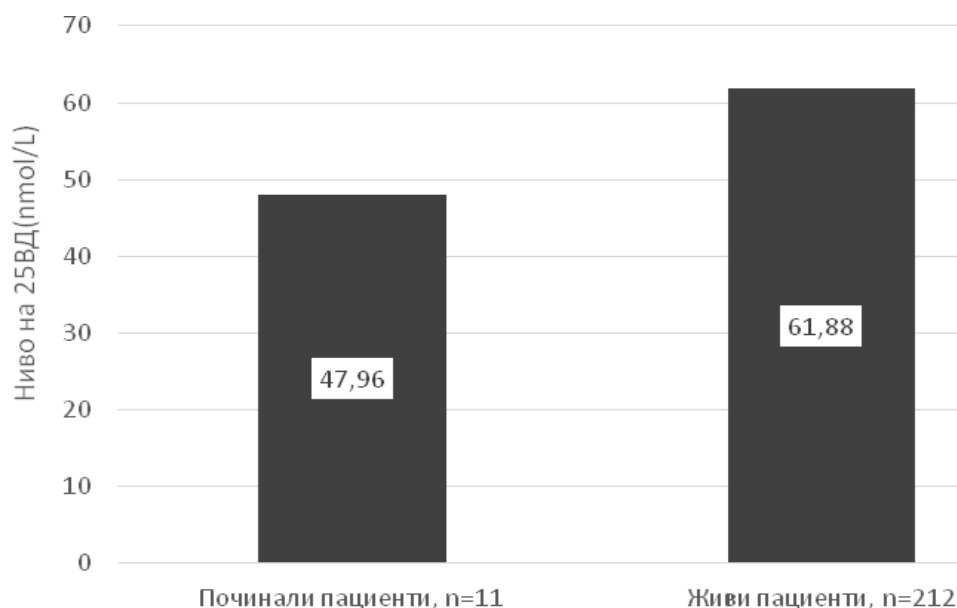
В тази група болни ( $n=196$ ) починалите болни бяха 11, като причините за смъртността са посочени на табл. 54.

Табл. 54. Причини за смърт при пациентите с давност на БТ над 36 месеца

Причина	Брой болни
Съдов инцидент	1
Неоплазии	3
Инфекции	2
Неустановена причина	5

В общата група болни отново нивото на ВД е по-високо при живите пациенти, като се запазва тенденцията по-лошият ВД статус да е свързан с по-висока ОС (фиг. 69 и 70).

Фиг. 69. Средни нива на 25ВД при починали и живи пациенти, БТ над 36 месеца



Фиг. 70. Разпределение на починалите пациенти според ВД статуса, БТ над 36 месеца



След уеднаквяване на болние по предикторите на 25ВД се селектираха 97 болни, 8 от които починали. Нивото на 25ВД при живите болни беше  $60.60 \pm 20.79$  nmol/L, а това при починалите пациенти беше  $34.08 \pm 13.04$  nmol/L, разликата беше статистически значима ( $p < 0.001$ ).

#### 6.13.4. Влияние на ВД върху ОС при пациентите с давност на БТ над 60 месеца

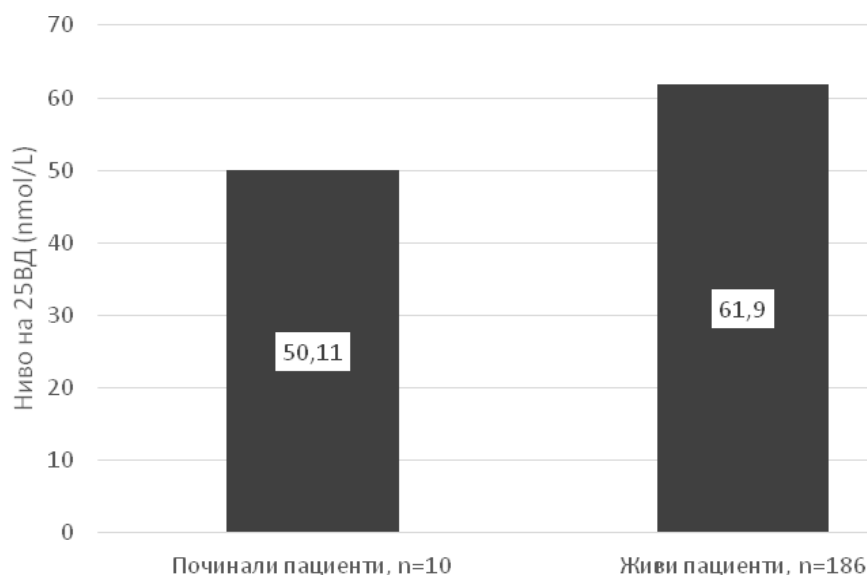
В тази група болни починалите бяха 10 (от общо 196), като причините за смъртност са обобщени в табл. 55.

Табл. 55. Причини за смърт при пациентите с давност на БТ над 60 месеца

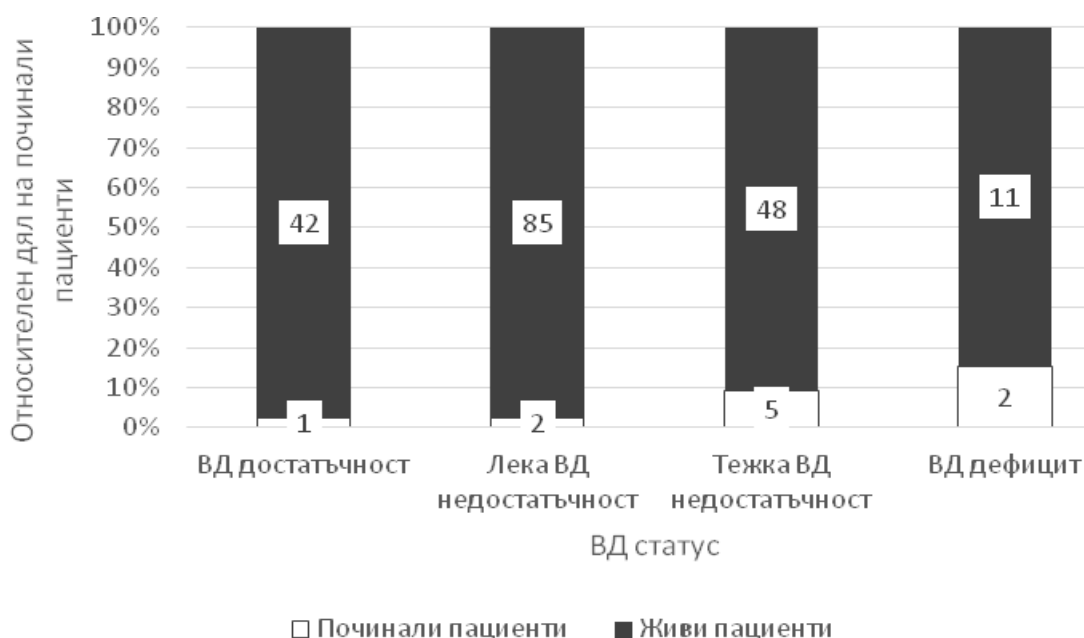
Причина	Брой болни
Съдов инцидент	1
Неоплазии	3
Инфекции	2
Неустановена причина	4

В общата група средният 25ВД е по-висок при живите пациенти - фиг. 71, като най-голям брой починали се установяват в групите с тежка ВД недостатъчност и ВД дефицит фиг. 72.

Фиг. 71. Средни нива на 25ВД при починали и живи пациенти, БТ над 60 месеца



Фиг. 72. Разпределение на починалите пациенти според ВД статуса, БТ над 60 месеца



След уеднаквяване на пациентите по предикторите на ВД се селектираха 78 пациента (7 починали). Средното ниво при починалите трансплантирани беше  $35.16 \pm 13.68$  nmol/L, които беше статистически значимо по-ниско от това при живите пациенти ( $60.33 \pm 21.24$  nmol/L),  $p=0.001$ .

### 6.13.5. Влияние на ВД върху ОС при пациентите с давност на БТ над 120 месеца

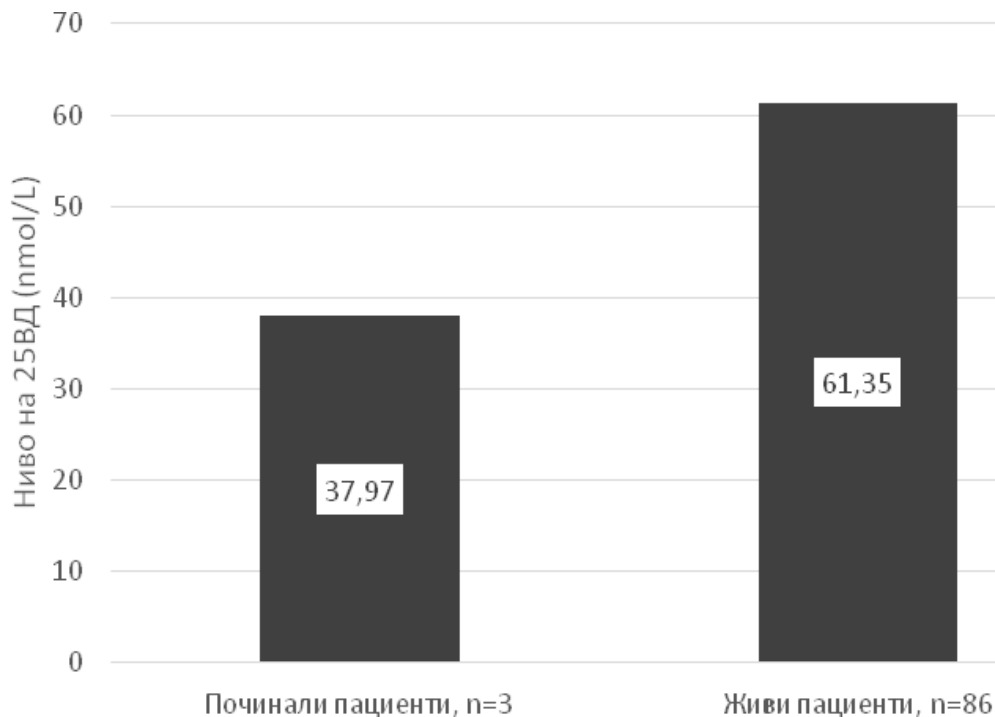
В най-малката група болни ( $n=89$ ) починалите пациенти бяха само 3. Причините за смъртност са посочени в табл. 56.

Табл. 56. Причини за смърт при пациентите с давност на БТ над 120 месеца

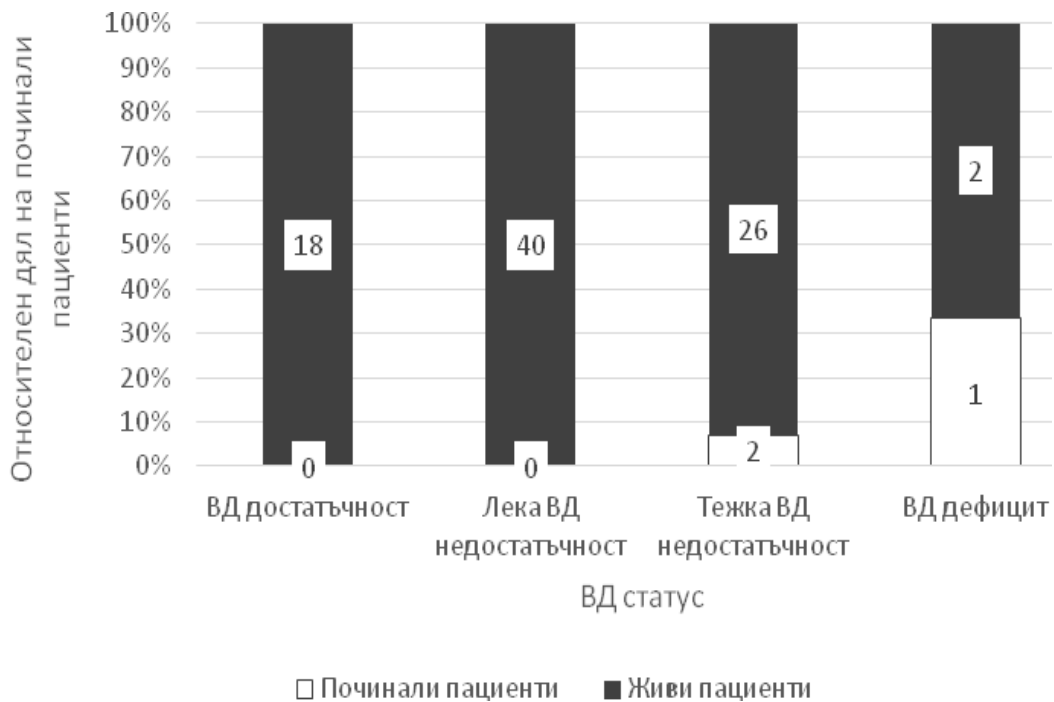
Причина	Брой болни
Съдов инцидент	0
Неоплазии	1
Инфекции	1
Неустановена причина	1

Отново починалите пациенти бяха с по-ниско средно ниво на 25ВД спрямо живите, като всички починали бяха с ВД дефицит или тежка ВД недостатъчност - фиг. 73 и фиг. 74.

Фиг. 73. Средни нива на 25ВД при починали и живи пациенти с давност над 120 месеца



Фиг. 74. Относителен дял на починалите пациенти, БТ над 120 месеца



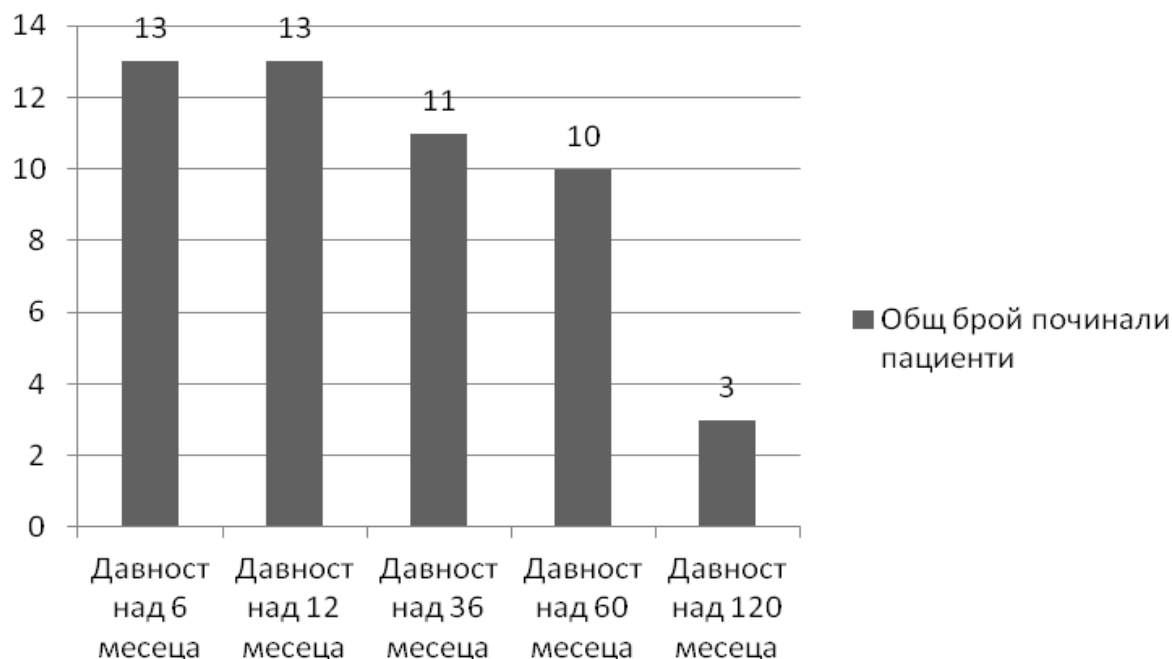
След уеднаквяване на двете групи пациенти по предикторите за ВД се селектираха 41 пациента (3 починали). Разликата между 25ВД беше отново статистически значима (при живи пациенти -  $61.43 \pm 14.78$  nmol/L,  $37.97 \pm 14.41$  nmol/L,  $p=0.013$ ).

### 6.13.6. Заключение

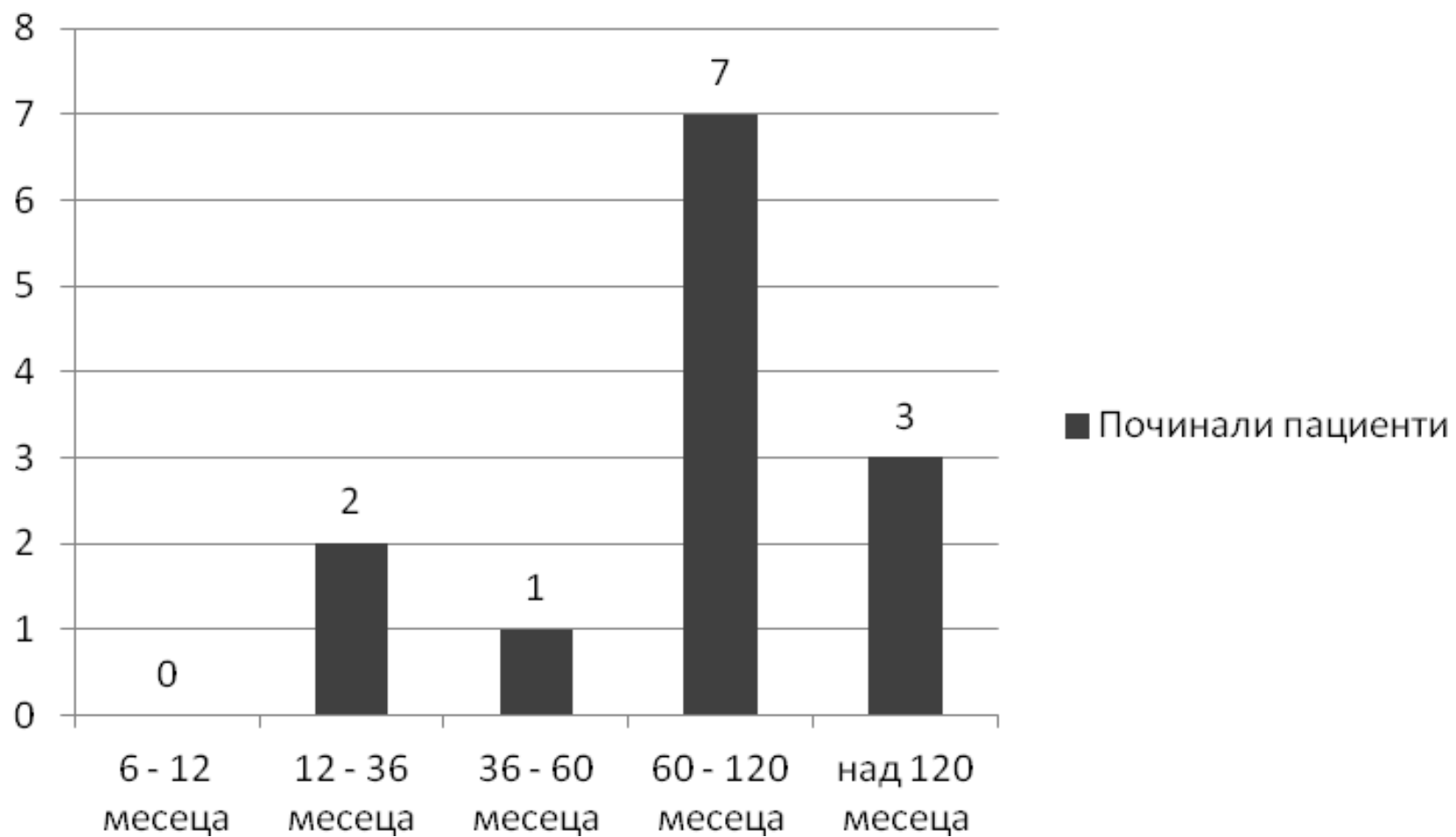
След представянето на данните по-горе за влиянието на ВД върху ОС при селектираните пациенти по показателите от глава 5.1.1. можем да направим следните изводи:

1. Налице е по-ниско ниво на 25ВД при починалите пациенти във всички групи според давността на БТ, неуеднаквени по факторите, влияещи на ВД.
2. С напредване на давността на БТ общият брой на починалите пациенти намалява (от 13 при давност над 6 и 12 месеца до 3 при давност над 120 месеца). Най-много пациенти са починали в диапазона 60<sup>и</sup> - 120<sup>и</sup> месец ( $n=7$ ), 2 пациента са починали в периода 12<sup>и</sup> - 36<sup>и</sup> месец, 1 в периода 36 - 60<sup>и</sup> месец (фиг. 75 и 76)
3. След уеднаквяване на живите и починалите пациенти по предикторите на ВД разликата се запазва, като при всички групи е статистически значима (графика 17).

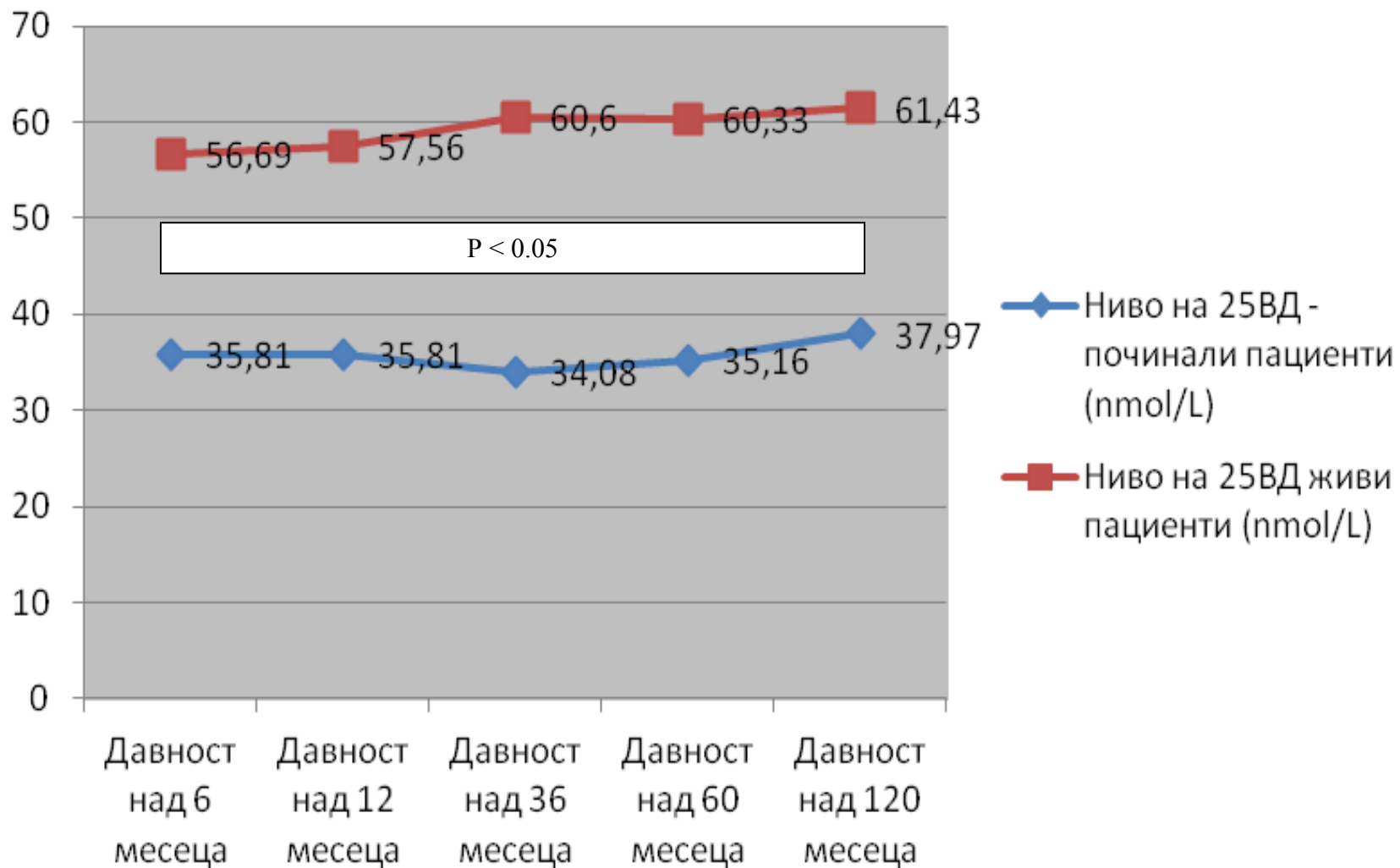
Фиг. 75. Динамика в общ брой починали според давността на БТ



Фиг. 76. Смъртност в различните периоди след БТ



Графика 17. Динамика на 25ВД при починали и живи болни според давност на БТ



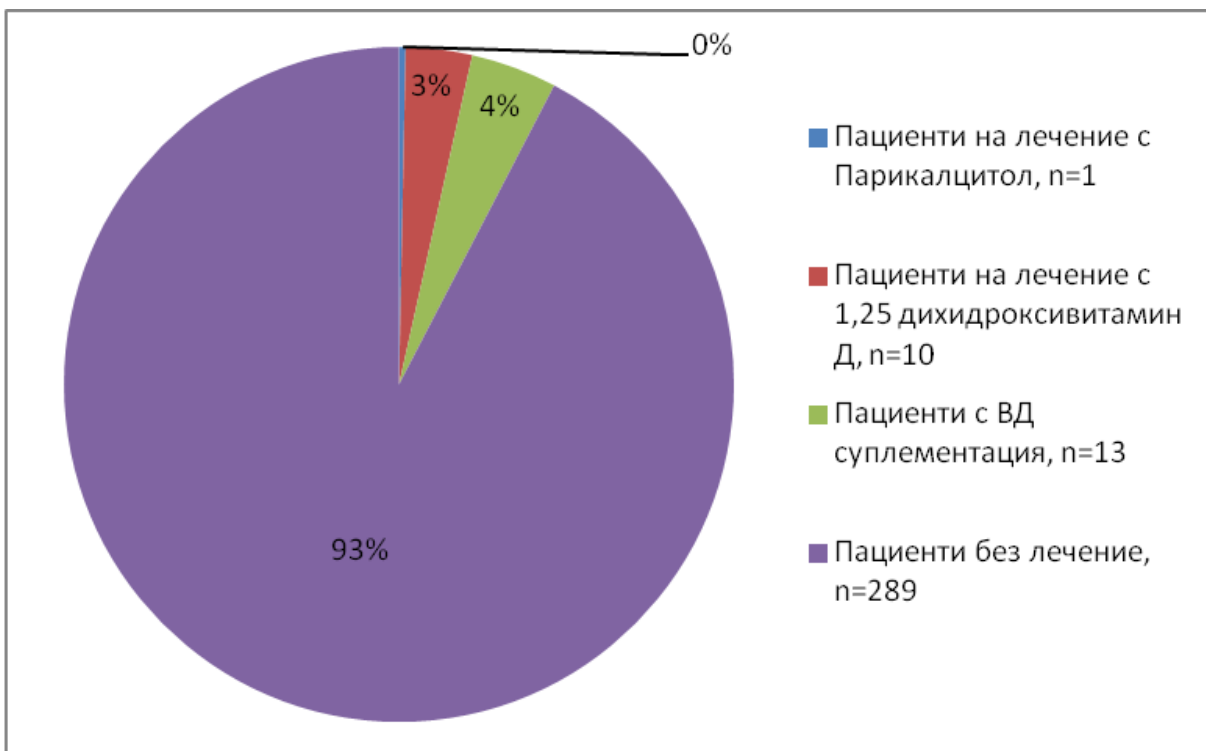
## **6.14. Терапевтични методи, влияещи на ВД статуса при пациенти с БТ**

В този раздел се разглежда основно провежданата ВД суплементация и нейната ефективност при пациентите с бъбречна трансплантация - в общата група от пациенти, както в тази селектирана по показателите от глава 5.1.1, с добавена суплементация в хода на контрола към ДБТ. В допълнение разгледахме влиянието на ВД аналози (Парикалцитол) и активен витамин Д (1,25ВД) върху ВД статуса и протеинурията при селектираните пациенти след добавянето на този вид лечение за вторичен хиперпаратиреоидизъм. С оглед на сравнително малката група болни с ВД суплементация статистическата обработка на данните се проведе с Mann-Whitney U test, а в групите с проследяване на показателите във времето - T- тест за чифтни данни ( paired samples T-test).

### **6.14.1. Разлика във ВД статуса при пациентите с и без ВД суплементация - обща група бъбречнотрансплантирани**

В тази група болни сравнихме нивото на 25ВД при пациентите с и без ВД суплементация. За целта селектирахме болните с давност на БТ над 6 месеца, без анамнеза за оперативно лечение на вторичен хиперпаратиреоидизъм, стабилна бъбречна функция и без съвместен прием на калциневринови инхибитори (КНИ) и mTOR – инхибитори (mTORI). Пациентите с напреднало чернодробно заболяване (степен по Child-Pugh B и C), активна чернодробна болест (покачване на АсАТ, АлАТ, γГТ поне два пъти над нормалните стойности), както и трансплантирани с екстремни стойности за ПТХ, ИТМ, 25ВД, но без да се изключват пациентите с ВД суплементация, лечение с активен Д (1,25ВД) или ВД аналози. Селектираха се общо 313 пациента, като разпределението на болните според лечението е показано на фигурата по-долу (фиг. 77)

Фиг. 77. Разпределение на пациентите според ВД провежданата терапия, n=313

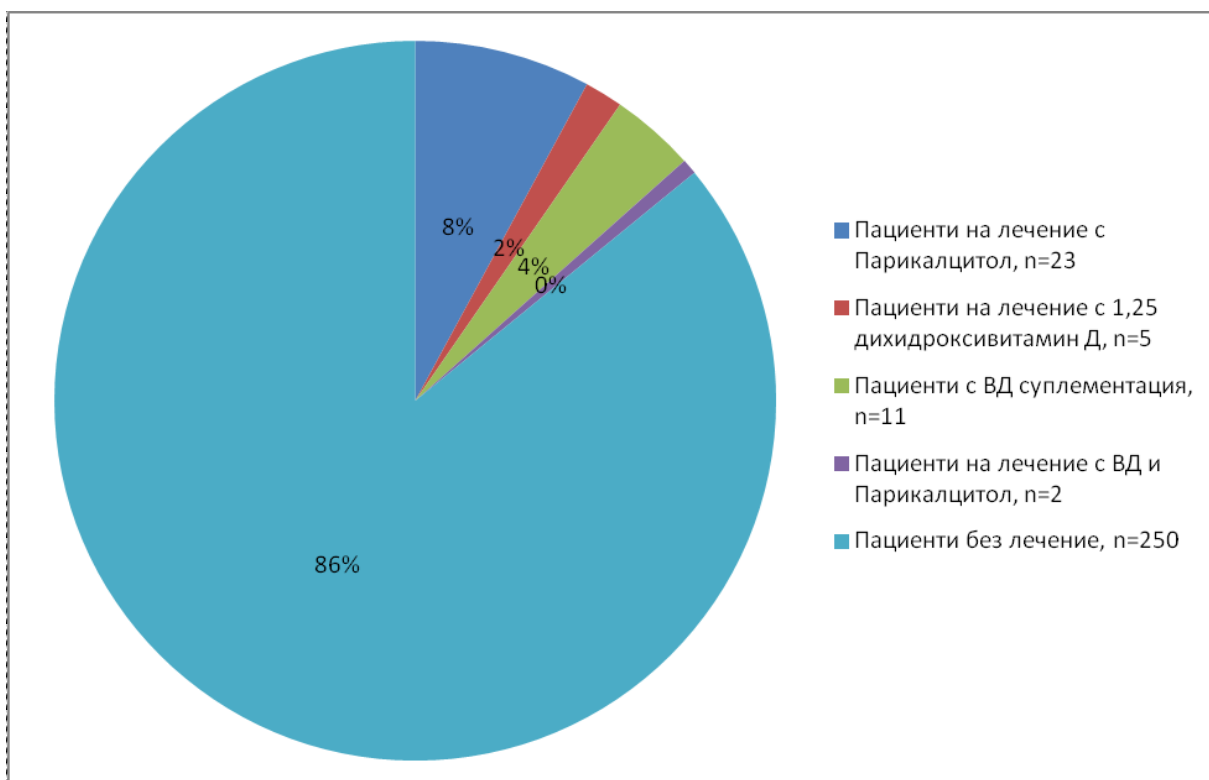


Сравнихме групите с ВД суплементация и без лечение. В групата с джбавен ВД към терапията дневната доза на витамин Д беше в рамките на 5 до 10 мкг/дневно (200 - 400IU). Двете групи бяха уеднаквени по пол, сезонност (време на тестване за 25ВД). Селектираха се 215 пациента, 7 от които бяха с ВД добавка. Средното ниво при пациентите със суплементация беше  $72.71 \pm 19.36$  nmol/L, а при тези без суплементация -  $52.91 \pm 20.60$  nmol/L. Разликата беше статистически значима -  $p=0.015$ .

#### **6.14.2. ВД суплементация, лечение с ВД аналози и активен ВД в селектираната група пациенти, n=289**

В групата бъбречнотрансплантирани, селектирани по показателите от глава 5.1.1. се проследи промята във ВД статуса при лечение с ВД, активен ВД, ВД аналози с давност поне 6 месеца. Селектирахме болни с инициирано такова лечение след първото изследване на 25ВД в периода май - ноември 2012 при контролните прегледи в ДБТ. Разпределението на пациентите според лечението е представено във фигура 78.

Фиг. 78. Разпределение на пациентите според вида лечение - ВД суплементация, 1,25ВД, ВД аналог, n=289.



С оглед на клиничният интерес при пациентите се проследи и ефекта от лечение-то върху протеинурията, като при всяка терапевтична група (ВД суплементация, лечение с Парикалцитол, калцитриол) се изолираха факторите, влияещи на протеинурията (вж. глава 6.9.1)

#### 6.14.2.1. Влияние на суплементацията с ВД

От 289 пациента, само при 11 се е провеждало заместително лечение с ВД (холекалциферол). Дозата варира от 5 мкг (при 5 от болните) до 240 мкг дневно (n=1). Разпределението на пациентите според дозата на ВД е посочено в табл. 57.

Табл. 57. Разпределение на пациентите според дозата на ВД, n=11.

Доза	Брой болни
5 µg (200IU)	5
25 µg (1000 IU)	2
32 µg (1280 IU)	2

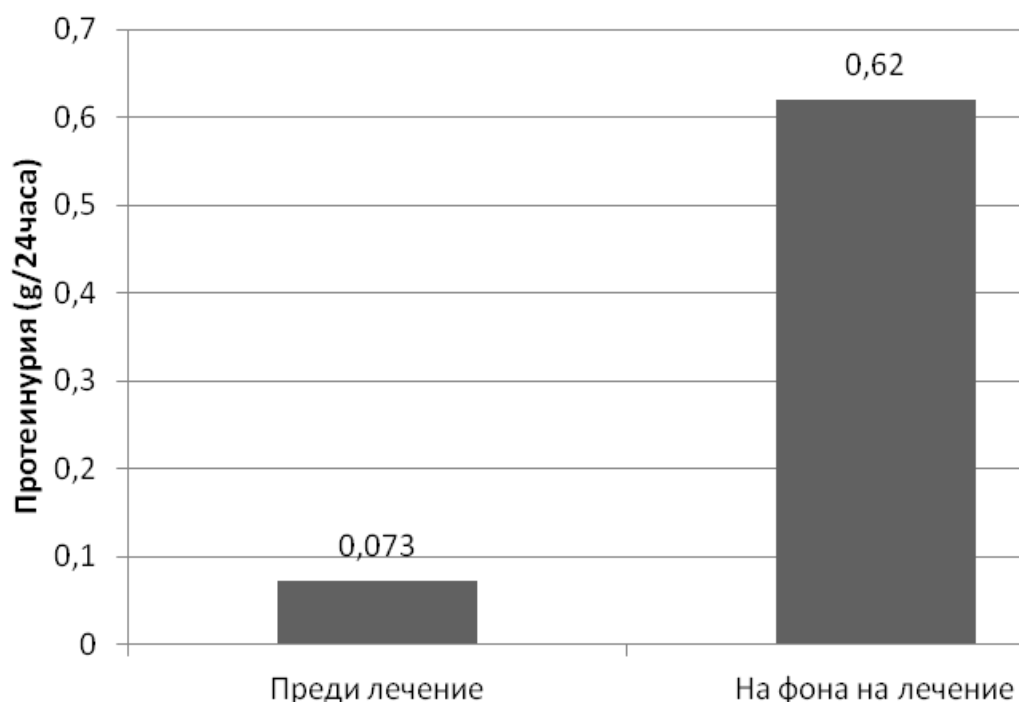
24 µg (960 IU)	1
240 µg (9600 IU)	1

При 1 пациент лечението с ВД беше прекратено поради лабораторни данни за хипералциемия. Средното ниво на 25ВД преди лечението беше  $63.80 \pm 28.73$  nmol/L, а на фона на лечение -  $77.16 \pm 29.18$  nmol/L. Въпреки че на фона на лечение стойностите са по-високи, разликата е статистически незначима ( $p=0.095$ ). Протеинурията при пациентите преди лечение с ВД беше  $0.24 \pm 0.12$  гр/24 часа, а след лечение -  $0.28 \pm 0.13$  гр/24 часа, разликата отново е статистически незначима ( $p=0.732$ ).

#### 6.14.2.2. Влияние на лечението с активен ВД (калцитриол)

Общо 5 болни бяха на терапия с калцитриол, като дозата варираше от 0,25 до 0,50 мкг/дневно. При пациентите е започната терапия с активен ВД поради персистиращ вторичен иперпаратиреоидизъм след БТ. При всички болни се отчете значимо понижаване на ПТХ при контролните изследвания. Решихме да оценим влиянието на лечението с активен ВД върху протеинурията. Не се установи статистически значима разлика и в протеинурията преди и след начало на лечението ( $p=0.09$ ) - вж фиг. 79.

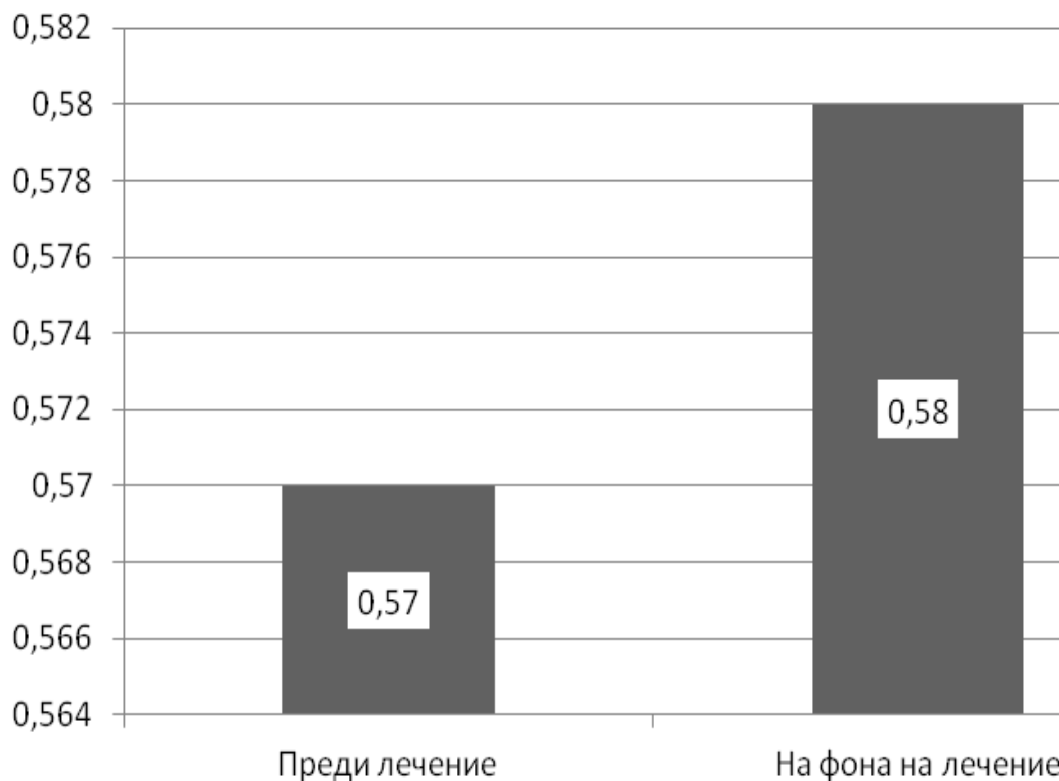
Фиг. 79. Разлика в протеинурията преди и на фона на лечение с калцитриол,  $n=5$



### 6.14.2.3. Влияние на лечението с Парикалцитол

На терапия с Парикалцитол бяха общо 25 пациента, поради данни за вторичен хиперпаратиреоидизъм след БТ; 2 не бяха включени в групата за изследване поради съвместен прием на холекалциферол. От 23 болни допълнително изключихме 13 поради наличие на реакция на отхвърляне в периода между изследванията на 25ВД, промяна в имуносупесивната терапия, значима промяна в бъбречната функция (показателите, влияещи на протеинурията от глава 6.9.1). При всички пациенти се установи значимо понижаване на ПТХ, дозата на Парикалцитол варираше от 1 до 3 мг/дневно. И тук тествахме антипротеинуричния ефект на лечението с Парикалцитол. Протеинурията преди лечение е  $0.57 \pm 0.24$  гр/24 часа, на фона на лечение  $0.58 \pm 0.14$  гр/24 часа ( $p=0.873$ ) - фиг. 80.

Фиг. 80. Разлика в протеинурията преди и след лечение с Парикалцитол, n=11

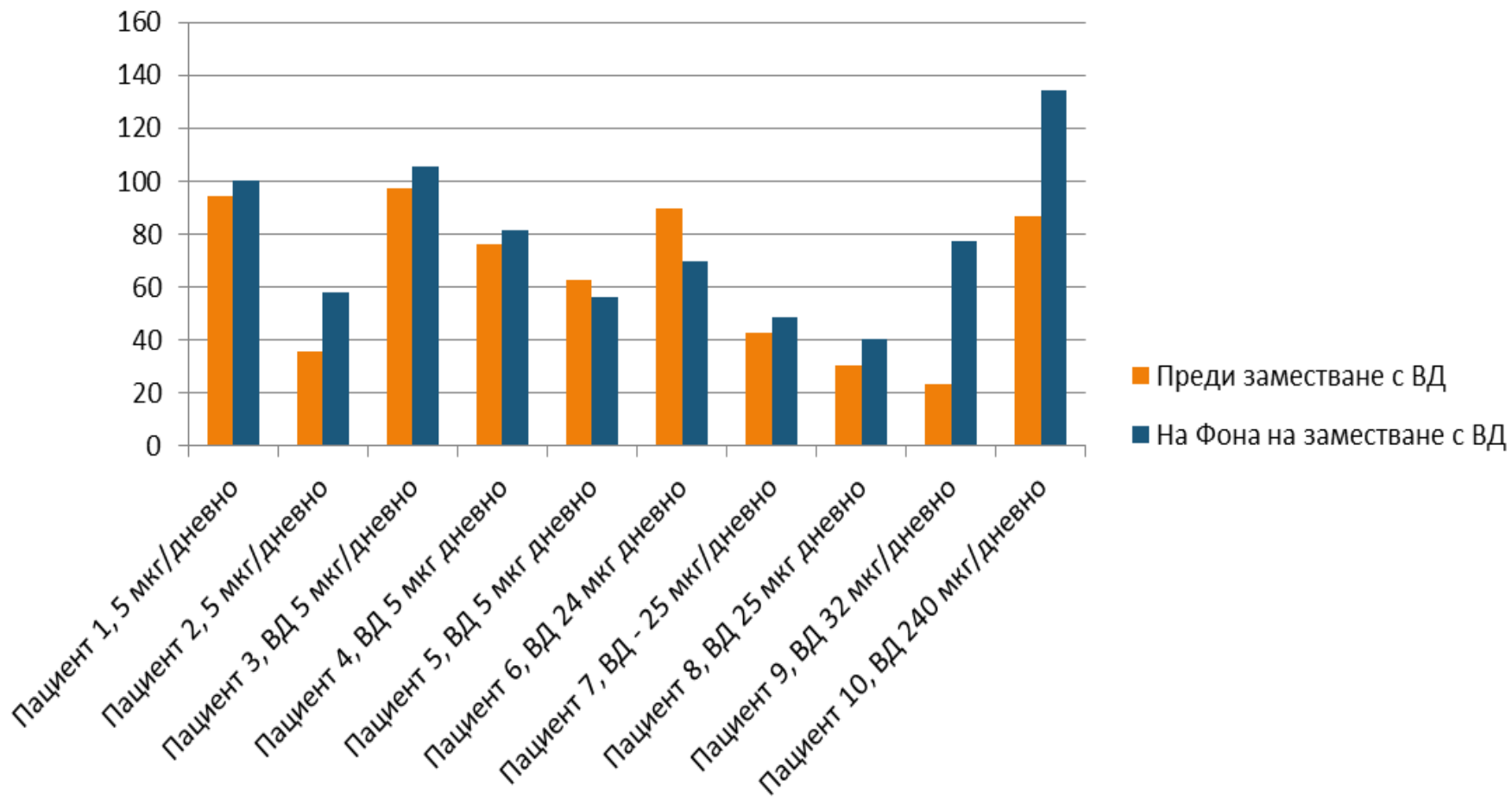


### 6.14.3. Заключение

Представените по-горе данни водят до следните изводи:

1. При сравнително малък брой пациенти е провеждана суплементация с ВД. В общата група болни (n=395) броят на тези пациенти е общо 23 (табл 14), а в селектираната група по глава 5.1.1. - общо 13 (фиг. 80). Най-честата доза на ВД е 5 до 10 мкг/дневно (200 - 400IU) дневно.
2. За периода декември 2012 - август 2014 е налице нарастване в използването на ВД аналог (Парикалцитол) - през до ноември 2012 само 1 пациент от общо 395 трансплантирани; през август 2014 в селектираната група болни броят е 25 от 289 пациенти (фиг. 80).
3. Сравнително ниската доза на ВД в общата група води до значимо по-високо ниво на 25ВД. При селектираните болни като цяло ВД суплементацията не води до подобрен ВД статус. При пациентите с ниските дози ВД (под 25 мкг/1000IU) промените са по-слабо изразени спрямо тези с по-голяма доза ВД - над 30 мкг/дневно (1200 IU/L). (фиг. 81).
4. Проведеното лечение с ВД в посочените дози не повлиява протеинурията при пациентите след БТ. Аналогична находка се установява при терапия със Парикалцитол и калцитриол, въпреки постигнатото значимо понижение на ПТХ. Трябва да се отбележи сравнително малкият брой болни, което намалява значимостта на тези резултати.

Фиг. 81. Промени в нивото на ВД преди и на фона на ВД суплементация, според дозата на ВД



## 7. Изводи

Резултатите, представени в глава 6 може да се обобщят в следните изводи:

1. Честотата на ВД недостатъчност (дефинирана като ниво на 25ВД под 80 pmol/L) е висока при пациентите с бъбречна трансплантация, като ВД статуса на тази популация се влошава в есенно-зимните месеци
2. Основните фактори, влияещи на нивото на 25ВД след БТ във всички групи според давността на БТ са пол - по-добър статус при мъже; ИТМ - влошава се с увеличаване на ИТМ; сезонност (тестуване в месеците юли, август, септември, март, април). В допълнение се отчитат като фактори наличие на ЗД в групите с давност на БТ над 6 и 12 месеца, прием на калциневринови инхибитори в групите с давност на БТ над 6 и 60 месеца.
3. Сезонността се отчита като фактор, влияещ на ВД статуса при всички групи пациенти според давността на БТ, като най-слабо изразена е сезонността при пациентите с давност на БТ над 120 месеца.
4. Сезонният спад на 25ВД освен месеците на тестуване се определя и от пол (по-голям при мъже) и ИТМ (по-голям при пациентите с по-нисък ИТМ). В края на тестовия период (април 2013) има конвергенция в нивата на 25ВД при мъже и жени – графика 10.
5. Женският пол е независим предиктор за по-лош ВД статус при пациентите след БТ, независимо от давността на БТ. Налице е лека тенденция към увеличаване на разликата на 25ВД между двата пола след 60-ти месец от БТ.
6. Ниският ИТМ се асоциира с по-високи нива на 25ВД във всички обследвани групи бъбречнотрансплантирани. По-добрият ВД статус при болните със затлъстяване II ст. трябва да се гълкува внимателно с оглед на малкия брой болни с ИТМ над 35
7. Захарният диабет е предиктор за по-ниски нива на 25ВД при пациенти с бъбречна трансплантация с давност над 6 и 12 месеца. Нашите данни не показват влияние на ВД статуса върху гликемичният контрол.

8. Калциневриновите инхибитори се асоциират с ниско ниво на 25ВД при пациенти с БТ с давност на трансплантацията след 6 и след 60 месеца. При пациентите с давност на БТ над 6 месеца и двата калциневринови инхибитори имат негативен ефект, докато при пациентите с давност над 60 месеца такова влияние се отчита само при ЦсА.
9. По-добрият ВД статус се асоциира с по-ниска протеинурия във всички групи пациенти според давността на БТ, с изключение на тези с давност над 120 месеца. Резултатите в тази група трябва да се интерпретират с внимание, тъй като селектираните пациенти с давност над 120 месеца са по-малко от останалите, както и това, че е налице нисък брой на пациенти с ВД дефицит.
10. Нивото на 25ВД при всички пациенти с неоплазии е незначително по-ниско от това на пациентите без малигнени заболявания, като е налице увеличаване на разликата с напредване давността на БТ. Пациенти с епителоидни кожни карциноми ( базоцелуларен и спиноцелуларен) имат по-високи нива на 25ВД от пациентите без Нео, като разликата остава статистически незначима във всички групи трансплантирани.
11. При пациентите с епителоидни малигнени некожни тумори се отчитат значимо по-ниски нива на 25ВД след 60<sup>и</sup> месец след БТ. Налице е тенденция към нарастване на разликата в средното ниво на 25ВД при пациенти с некожни карциноми и без Нео с увеличаване давността на БТ.
12. Няма статистическа разлика във ВД статуса при пациенти с често рецидивиращи уроинфекции (над 3 годишно) и пациенти без чести уроинфекции.
13. След уеднаквяване на групите с и без РО по предикторите за 25ВД пациентите без РО са със статистически по-високо ниво на 25ВД спрямо тези с РО. Разликата е статистически значима при пациентите с давност на БТ над 12, 36 и 60 месеца.
14. Налице е по-ниско ниво на 25ВД при починалите пациенти във всички групи според давността на БТ, неуеднаквени по факторите, влияещи на ВД. След уеднаквяване на двете групи по предикторите на ВД разликата се запазва, като при всички групи е статистически значима. Тези данни ни позволяват категорично да

твърдим, че по-лошият ВД статус е свързан с по-висока обща смъртност при пациентите отговарящи на селекционните критерии.

15. При сравнително малък брой пациенти е провеждана суплементация с ВД. Най-честата доза на ВД е 5 до 10 мкг/дневно (200 - 400IU) дневно. Сравнително ниската доза на ВД в общата група води до значимо по-високо ниво на 25ВД. При селектираните болни ВД суплементацията не води до подобрен ВД статус. При пациентите със суплементация над 30 мкг/дневно (1200IU/l) се отчита значително подобрение във ВД статуса.
16. Проведеното лечение с ВД (холекалциферол) в посочените дози не повлиява протеинурията при пациентите след БТ, същият резултат се наблюдава и при пациентите третирани с парикалцитол и калцитриол.

## 8. Приноси

1. За първи път в България се прави оценка на ВД статуса след бъбречна трансплантация. Изследването на 25ВД се наложи в рутинната клинична практика, което дава възможност за корекция и проследяване на 25ВД, а оттам и в намаляване на риска от следтрансплантационни проблеми като намаляване на костната плътност и патологични фрактури.
2. Установиха се предиктори за субоптимален ВД статус (пол, сезонност, ИТМ, имunosупресия, захарен диабет), което улеснява откриването на рискови болни за ВД недостатъчност след БТ. Доказа се висока честота на ВД недостатъчност при бъбречнотрансплантираните пациенти.
3. За първи път в България се оцениха плейотропните ефекти на ВД при пациенти с БТ. По-добрият ВД статус се асоциира с по-ниска протеинурия, по-ниска честота на реакции на отхвърляне, по-ниска смъртност при различните групи пациенти според давността на БТ. Не се установи връзка между 25ВД и честотата на хроничните уроинфекции.
4. Оцени се ефекта на лечението с холекалциферол при бъбречнотрансплантирани болни върху ВД статуса. Установи се липса на ефект от 25ВД поради сравнително ниските дози на холекалциферол, като се отчете значимо подобряване във ВД нивата при суплементация с над 1200IU/дневно.
5. За първи път се оцени ефекта на калцитриол и парикалцитол върху протеинурията при пациенти след БТ. Не се установи статистически значим ефект върху протеинурията при приложение на тези два припарата след уеднаквяване на групите по рисковите фактори за протеинурия.

## 9. Публикации, свързани с дисертационният труд

1. Филипов Ж, Златков Б, Паскалев Е, Свиначов Д, Владимиров В. Витамин Д статус при пациенти с бъбречна трансплантация – Медицински Преглед, 49, 2013, 16 – 9.
2. Филипов Ж, Златков Б, Паскалев Е, Хубанов Н, Свиначов Д. Сезонни вариации в нивото на 25-хидроксивитамин Д при български пациенти с бъбречна трансплантация. Медицински преглед, 50, 2014, 37 – 42.
3. Филипов Ж, Златков Б, Паскалев Е, Хубанов Н, Свиначов Д. Връзка между нивото на 25-хидроксивитамин Д и захарен диабет и гликемичен контрол при пациенти с бъбречна трансплантация. Нефрология, диализа и трансплантация, 19, 2013, 41-5.
4. Filipov J, Zlatkov B, Dimitrom EP, Svinarov D. Relationship between vitamin D status and immunosuppressive therapy in kidney transplant recipients. BIOTECHNOLOGY & BIOTECHNOLOGICAL EQUIPMENT (под печат)

## 10. Участия в национални конференции и конгреси

1. Филипов Ж., Златков Б., Димитров М., Генов Д., Ортова М., Христова Л., Симеонов П., Паскалев Е., Свинаров Д. – Дефицит на витамин Д и бъбречна трансплантация - 6-ти Национален конгрес по Нефрология, 5-7 Октомври 2012, хотел Новотел, гр. Пловдив
2. Филипов Ж, Паскалев Е, Златков Б, Свинаров Д. Коригируеми фактори, влияещи на нивото на витамин Д при пациенти с бъбречна трансплантация. Национална Конференция по Нефрология, 18 – 20 октомври 2013, гр. Хисар
3. Филипов Ж, Паскалев Е, Златков Б, Свинаров Д Влияние на контрола на захарния диабет върху нивата на 25-хидроксивитамин Д при пациенти с бъбречна трансплантация. Национална Конференция по Нефрология, 18 – 20 октомври 2013, гр. Хисар
4. Ж. Филипов, Б. Златков, Е. Паскалев, Д. Свинаров. По-високи нива на 25-хидроксивитамин Д се асоциират с по-ниска протеинурия при трансплантирани пациенти. Национална конференция по нефрология, гр. Хисар, 2014год.

## 11. Международни участия

1. Filipov J, Zlatkov B, Paskalev E, Svinarov D. Relationship between vitamin D status and type of immunosuppression in kidney transplant recipients. Platform presentation, September 8-11, 2013, Vienna, Austria
2. Jean Filipov, Bulgaria. “Vitamin D status in renal transplant patients” – ERA-EDTA CME course, Hissar, October 2014.
3. Jean Filipov, Borelli Zlatkov, Emil Paskalev, Dobrin Svinarov. Seasonal variations in 25-hydroxyvitamin D level in kidney transplant recipients: who is more at risk? Poster presentation, ERA-EDTA Congress, Amsterdam 2014
4. Jean Filipov, Borelli Zlatkov, Emil Paskalev, Dobrin Svinarov. Higher level of 25-hydroxyvitamin D predicts lower proteinuria in kidney transplant recipients. Poster presentation, ERA-EDTA Congress, Amsterdam, 2014

## 12. Библиография

1. Борисова А-М, Шинков А, Влахов Й, Даковска Л, Тодоров Т, Свиначков Д, Касабова Л. Сравнителен анализ на разпространението на дефицит и недостатъчност на витамин Д в различен тип населени места в България. Ендокринология, XVII №3,2012; 143 - 155.
2. Борисова А-М, Шинков А, Влахов Й, Даковска Л, Тодоров Т, Свиначков Д, Касабова Л. Честота на дефицит, недостатъчност и достатъчност в българската популация >20 – 80 години. Енокринология, XVII №3,2012; 122 - 134.
3. Герова Д, Галунска Б, Желязкова – Савова М, Паскалев Д. Витамин Д отвъд рубикона на рахита. Варна, Изд. Къща Стено, 2012: 33 – 35.
4. Паскалев Е. Остеопороза при пациенти с бъбречна трансплантация. Ревматология, X, 2002, 4, 26 – 31.
5. Aakhus S, Dahl K, Wideroe TE. Cardiovascular disease in stable renal transplant patients in Norway: Morbidity and mortality during a 5-yr follow-up. Clin Transplant 2004; 18: 596–604.
6. Abbott KC, Lentine KL, Bucci JR et al. Impact of diabetes and hepatitis after kidney transplantation on patients who are affected by hepatitis C virus. J Am Soc Nephrol 2004; 15: 3166–3174.
7. Abe, E, Miyaura, C, Sakagami, H, Takeda, M, Konno, K, Yamazaki, T, Yoshiki, S & Suda, T (1981) Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. Proc Natl Acad Sci USA 78, 4990–4994.
8. Adams JS, Hewison M. Hypercalcemia caused by granuloma-forming disorders. In: Favus, MJ, ed, Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 6th ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2006:200-2.
9. Adorini L. Intervention in autoimmunity: the potential of vitamin D receptor agonists. Cell Immunol. 2005; 233(2):115–24.
10. Agarwal R, Acharya M, Tian J, et al. Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. Kidney Int. 2005; 68:2823–2828.

11. Agarwal R.: Vitamin D, proteinuria, diabetic nephropathy, and progression of CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 4: 1523–1528, 2009.
12. Alborzi P, Patel NA, Peterson C, et al. Paricalcitol reduces albuminuria and inflammation in chronic kidney disease: a randomized double-blind pilot trial. *Hypertension*. 2008; 52:249–255.
13. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2013. *Diabetes Care*. 2013 Jan;36 Suppl 1:S11-66.
14. Amer H, Cosio FG. Significance and Management of Proteinuria in Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Dec;20(12):2490-2.
15. Anderson PH, O'Loughlin PD, May BK, Morris HA. Quantification of mRNA for the vitamin D metabolizing enzymes CYP27B1 and CYP24 and vitamin D receptor in kidney using real-time reverse transcriptase- polymerase chain reaction. *J Mol Endocrinol*. 2003 Aug; 31(1):123-32.
16. Andrade-Sierra J, Contreras AM, Monteon FJ et al. Risk factors and incidence of posttransplant diabetes mellitus in Mexican kidney recipients. *Arch Med Res* 2006; 37: 961–966.
17. Artaza JN, Norris KC. Vitamin D (1, 25D) inhibits cardiomyoblasts cell proliferation by promoting cell cycle arrest and enhances cardiomyotubes formation without inducing apoptosis. *J Investig Med*2009; 57: 112
18. Artaza JN, Norris KC. Vitamin D reduces the expression of collagen and key profibrotic factors by inducing an antifibrotic phenotype in mesenchymal multipotent cells. *J Endocrinol*. 2009 Feb; 200(2):207–21.
19. Bhalla AK, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation. *J Immunol*. 1984; 133(4):1748–54.
20. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr*2006;84:18-28. Erratum, *Am J Clin Nutr*2006;84:1253.
21. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr*2006;84:18-28.

22. Black PN, Scragg R. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and pulmonary function in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Chest* 2005; 128:3792-8.
23. Bland R, Markovic D, Hills CE, Hughes SV: Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase in pancreatic islets. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121: 89–90, 2004
24. Blutt, SE, McDonnell, TJ, Polek, TC & Weigel, NL (2000) Calcitriol-induced apoptosis in LNCaP cells is blocked by overexpression of Bcl-2. *Endocrinology* 141, 10–17.
25. Bodnar LM, Krohn MA, Simhan HN. Maternal vitamin D deficiency is associated with bacterial vaginosis in the first trimester of pregnancy. *J Nutr.* 2009; 139(6):1157–61.
26. Bolland MJ, Grey AB, Ames RW et al (2007) The effects of seasonal variation of 25-hydroxyvitamin D and fat mass on a diagnosis of vitamin D sufficiency. *Am J Clin Nutr* 86:959–964.
27. Boonstra A, et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol.* 2001; 167(9):4974–80.
28. Borissova AM, Tankova T, Kirilov G et al. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Int J Clin Pract* 2003; 57: 258–261
29. Bourlon PM, Billaudel B, Faure-Dussert A: Influence of vitamin D3 deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas. *J Endocrinol* 160:87–95, 1999
30. Brenza HL and DeLuca HF. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1 $\alpha$ -hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Arch Biochem Biophys* 381: 143–152, 2000.
31. Bringhirst F et al. *Endocrinology and Metabolism in: Harrison's principles of Internal medicine*, 16<sup>th</sup> edition, McGraw – Hill 2005:2246 – 2249.
32. Broe KE, Chen TC, Weinberg J, Bischoff-Ferrari HA, Holick MF, Kiel DP. A higher dose of vitamin D reduces the risk of falls in nursing home residents: a randomized, multiple-dose study. *J Am Geriatr Soc* 2007;55:234-9.
33. Camargo CA Jr, Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, et al. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. *Am J Clin Nutr* 2007; 85:788-95.

34. Campbell, MJ, Elstner, E, Holden, S, Uskokovic, M & Koeffler, HP (1997) Inhibition of proliferation of prostate cancer cells by a 19-nor-hexafluoride vitamin D3 analogue involves the induction of p21waf1, p27kip1 and E-cadherin. *J Mol Endocrinol* 19, 15–27.
35. Cannell JJ, et al. Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol Infect.* 2006; 134(6):1129–40.
36. Challa A, Ntourntoufi A, Cholevas V et al (2005) Breastfeeding and vitamin D status in Greece during the first 6 months of life. *Eur J Pediatr* 164:724–729.
37. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 1997;7:439-43.
38. Chen H, Hewison M, Hu B, Adams JS. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein(hnRNP) binding to hormone response elements: a cause of vitamin D resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:6109-14.
39. Chen S, et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol.* 2007; 179(3):1634–47.
40. Chen S, Olsen K, Grisby C et al. Vitamin D activates type A natriuretic peptide receptor gene transcription in inner medullary collecting duct cells. *Kidney Int* 2007; 72: 300–306
41. Chen Y, Kong J, Sun T, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) suppresses inflammation-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 by blocking nuclear factor-kappaB activation. *Arch Biochem Biophys.* 2011; 507:241–247.
42. Ching S, Kashinkunti S, Niehaus MD, et al. (2011) Mammary adipocytes bioactivate 25-hydroxyvitamin D and signal via vitamin D receptor, modulating mammary epithelial cell growth. *J Cell Biochem* 112, 3393–3405.
43. Chonchol M., Scragg R.: 25-Hydroxyvitamin D, insulin resistance, and kidney function in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Kidney Int.* 2007; 71(2):134-139.
44. Christensen EI, Willnow TE. Essential role of megalin in renal proximal tubule for vitamin homeostasis. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Oct;10(10):2224-36
45. Chrysant SG, Chrysant GS. An update on the cardiovascular pleiotropic effects of milk and milk products. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2013 Jul;15(7):503-10.

46. Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet*. 1982 Jan 9;1(8263):74-6.
47. Colston, K, Colston, MJ & Feldman, D (1981) 1,25-dihydroxyvitamin D3 and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology* 108, 1083–1086.
48. Correale J, Ysraelit MC, Gaitan MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain*. 2009;132(Pt 5):1146–60.
49. Costa de Oliveira CM, Mota MU, Mota RS, Nóbrega JO, Melo DS, Vieira AS, et al. Prevalence and staging of chronic kidney disease in renal transplant recipients. *Clin Transplant*. 2009 Sep-Oct;23(5):628-36.
50. Craig SM, Yu F, Curtis JR, Alarcón GS, Conn DL, Jonas B, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Callahan%20LF%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=20032100](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Callahan%20LF%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=20032100) et al. Vitamin D status and its associations with disease activity and severity in African Americans with recent-onset rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2010;37(2):275–81.
51. Cross HS, Bareis P, Hofer H, Bischof MG, Bajna E, Kriwanek S. 25-Hydroxyvitamin D3-1<sub>α</sub>-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids* 2001; 66:287–92.
52. Cynthia Aranow. Vitamin D and the Immune System. *J Investig Med*. 2011 August; 59(6): 881–886.
53. Dai C, Stolz DB, Kiss LP, et al. Wnt/beta-catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20:1997–2008.
54. Daniel C, et al. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 324(1):23–33.
55. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 2005;16:713-6.
56. de Boer IH et al. Vitamin D deficiency. in: *Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation Companion to Brenner & Rector's The Kidney*, 3rd edition, Elsevier Inc., 2010: 115 – 118.

57. de Boer IH, Ioannou GN, Kestenbaum B, et al. 25-Hydroxyvitamin D levels and albuminuria in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) *Am J Kidney Dis.* 2007;50:69–77.
58. de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, et al. Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2010; 376:1543–1551.
59. Deb DK, Chen Y, Zhang Z, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses high glucose-induced angiotensinogen expression in kidney cells by blocking the NF- $\kappa$ B pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 296:F1212–F1218.
60. Deb DK, Chen Y, Zhang Z, Zhang Y, Szeto FL, Wong KE, Kong J, Li YC. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses high glucose-induced angiotensinogen expression in kidney cells by blocking the NF- $\kappa$ B pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 296: F1212–8.
61. Deb DK, Sun T, Wong KE, et al. Combined vitamin D analog and AT1 receptor antagonist synergistically block the development of kidney disease in a model of type 2 diabetes. *Kidney Int.* 2010; 77:1000–1009.
62. Deb DK, Wang Y, Zhang Z, et al. Molecular mechanism underlying 1,25-dihydroxyvitamin D regulation of nephrin gene expression. *J Biol Chem.* 2011
63. Ding C, Gao D, Wilding J, Trayhurn P, Bing C. Vitamin D signalling in adipose tissue. *Br J Nutr.* 2012 Dec 14;108(11):1915-23.
64. Dobnig H, Pilz S. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1, 25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2008; 168: 1340–1349
65. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol* 2005; 289: F8–28.
66. El-Hajj Fuleihan G, Nabulsi M, Choucair M, et al. Hypovitaminosis D in healthy schoolchildren. *Pediatrics.* 2001;107:E53.
67. Ersfeld DL, Rao DS, Body JJ et al. Analytical and clinical validation of the 25 OH vitamin D assay for the LIAISON automated analyzer. *Clin Biochem*2004; 37: 867–874.
68. Eyal O, Aharon M, Safadi R, Elhalel MD. Serum vitamin D levels in kidney transplant recipients: the importance of an immunosuppression regimen and sun exposure. *Isr*

Med Assoc J. 2013 Oct;15(10):628-33.

69. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the vitamin D receptor and 1 $\alpha$ -hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* 2005;29: 21-30.
70. Falkiewicz K, Boratynska M, Speichert-Bidzinska B et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D deficiency predicts poorer outcome after renal transplantation. *Transplant Proc* 2009; 41: 3002–3005
71. Fishbane S, Chittineni H, Packman M, Dutka P, Ali N, Durie N.: Oral paricalcitol in the treatment of patients with CKD and proteinuria: A randomized trial. *Am J Kidney Dis* 54: 647–665, 2009.
72. Fishbane S, Chittineni H, Packman M, et al. Oral paricalcitol in the treatment of patients with CKD and proteinuria: a randomized trial. *Am J Kidney Dis*. 2009; 54:647–652.
73. Forman JP, Williams JS, Fisher ND. Plasma 25-hydroxyvitamin D and regulation of the renin-angiotensin system in humans. *Hypertension*. 2010 May;55(5):1283-8.
74. Forouhi NG, Luan J, Cooper A, Boucher BJ, Wareham NJ: Baseline serum 25-hydroxyvitamin D is predictive of future glycemic status and insulin resistance: the Medical Research Council Ely prospective study, 1990–2000. *Diabetes* 57: 2619–2625, 2008
75. Gallo RL, et al. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(6):823–31.
76. Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention. *Am J Public Health*. 2006 Feb; 96(2):252-61.
77. Garland FC, Garland, CF, Gorham, ED & Young, JF (1990) Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Prev Med* 19, 614–622.
78. Garland, CF & Garland, FC (1980) Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol* 9, 227–231.
79. Gascon-Barre M. The vitamin D 25- hydroxylase. In: Feldman D, Pike JW, Glorieux FH, eds. *Vitamin D*. 2nd ed. Boston: Elsevier Academic Press, 2005:47-68.

80. Gaugris S, Heaney RP, Boonen S, Kurth H, Bentkover JD, Sen SS. Vitamin D inadequacy among post-menopausal women: a systematic review. *QJM*. 2005; 98:667-676.
81. Ginde AA, Liu MC, Camargo CA Jr. Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population, 1988-2004. *Arch Intern Med*. 2009 Mar 23;169(6):626-32.
82. Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA., Jr. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med*. 2009; 169(4):384–90.
83. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW et al. 25-Hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men. A prospective study. *Arch Intern Med* 2008; 168: 1174–1180
84. Giovannucci, E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: A review (United States). *Cancer Causes Control* 2005; 16: 83–95.
85. Gloth FM III, Alam W, Hollis B. Vitamin D vs. broad spectrum phototherapy in the treatment of seasonal affective disorder. *J Nutr Health Aging* 1999;3:5-7.
86. Gordon CM, DePeter KC, Feldman HA, Grace E, Emans SJ. Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2004; 158:531-7.
87. Gourishankar S, Jhangri GS, Tonelli M et al. Development of diabetes mellitus following kidney transplantation: A Canadian experience. *Am J Transplant* 2004; 4: 1876–1882.
88. Graciano ML, Cavaglieri Rde C, Delle H, Dominguez WV, Casarini DE, Malheiros DM, Noronha IL. Intrarenal renin-angiotensin system is upregulated in experimental model of progressive renal disease induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 1805–1815.
89. Grau MV, Baron JA, Sandler RS, et al. Vitamin D, calcium supplementation, and colorectal adenomas: results of a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95(23):1765–1771.
90. Gregory JM, Lilley JS, Misfeldt AA, Buscariollo DL, Russell WE, Moore DJ: Incorporating type 1 diabetes prevention into clinical practice. *Clinical Diabetes* 28:61–70, 2010.

91. Griffin MD, et al. Dendritic cell modulation by 1 $\alpha$ ,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(12):6800–5.
92. Gröber U, Kisters K. Influence of drugs on vitamin D and calcium metabolism. *Dermatoendocrinol*. 2012 Apr 1; 4(2):158-66.  
[http://ajprenal.physiology.org/lookup/external-ref?access\\_num=10.1006/abbi.2000.1970&link\\_type=DOI](http://ajprenal.physiology.org/lookup/external-ref?access_num=10.1006/abbi.2000.1970&link_type=DOI)
93. Guijarro C, Egido J. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int*. 2001; 59:415–424.
94. Guyton AC, Hall JE. Parathyroid Hormone, Calcitonin, Calcium and Phosphate Metabolism, Vitamin D, Bone and Teeth. In: *Textbook of Medical Physiology*, 10<sup>th</sup> edition, Philadelphia, USA, W.B. Saunders, 2000: 904-906.
95. Harinarayan CV, Ramalakshmi T, Prasad UV et al (2007) High prevalence of low dietary calcium, high phytate consumption, and vitamin D deficiency in healthy south Indians. *Am J Clin Nutr* 85:1062–1067.
96. Harris SS, Soteriades E, Coolidge JA, Mudgal S, Dawson-Hughes B. Vitamin D insufficiency and hyperparathyroidism in a low income, multiracial, elderly population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85(11):4125–4130.
97. Haussler MR, Haussler CA, Jurutka PW, Thompson PD, Hsieh JC, Remus LS The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J Endocrinol*. 1997 Sep;154 Suppl:S57-73.
98. He W, Kang YS, Dai C, Liu Y. Blockade of Wnt/beta-catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22:90–103.
99. Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* 2003;22:142-6.
100. Hershberger PA, et al. Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances paclitaxel antitumor activity in vitro and in vivo and accelerates paclitaxel-induced apoptosis. *Clin Cancer Res*. 2001; 7:1043–1051.
101. Hershberger PA, et al. Cisplatin potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced apoptosis in association with increased mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MEKK-1) expression. *Mol Cancer Ther*. 2002;1:821–829.

102. Hewison M, Kantorovich V, Liker HR, Van Herle AJ, Cohan P, Zehnder D, et al. Vitamin D-mediated hypercalcemia in lymphoma: evidence for hormone production by tumor-adjacent macrophages. *J Bone Miner Res.* 2003 Mar;18(3):579-82.
103. Hines C. Vitamins, absorption and malabsorption *Arch Intern Med* 1978; 138: 619-21.
104. Holick MF, B. R.; Biancuzzo, R. M.; Chen, T. C.; Klein, E. K.; Young, A.; Bibuld, D.; Reitz, R.; Salameh, W. et al. (2007). Vitamin D2 is as Effective as Vitamin D3 in Maintaining Circulating Concentrations of 25-Hydroxyvitamin D. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93 (3): 677–681
105. Holick MF, Matsuoka LY, Wortsman J. Age, vitamin D, and solar ultraviolet. *Lancet.* 1989;2:1104-1105.
106. Holick MF, Siris ES, Binkley N, et al. Prevalence of vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:3215-3224.
107. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin. Proc.* 2006; 81 (3): 353–73.
108. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006; 116:2062-72.
109. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007 Jul 19;357(3):266-81.
110. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:362–71.
111. Hollis BW. Editorial: The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: no easy task. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3149–3151.
112. Holvik K, Meyer HE, Haug E, Brunvand L (2005) Prevalence and predictors of vitamin D deficiency in five immigrant groups living in Oslo, Norway: the Oslo Immigrant Health Study. *Eur J Clin Nutr* 59:57–63.
113. Hughes MR, Brumbaugh PF, Haussier MR, Wergedal JE & Baylink DJ 1975 Regulation of serum 1,25-dihydroxyvitamin D3 by calcium and phosphate in the rat. *Science* 190 578—580.

114. Ito I, Waku T, Aoki M, Abe R, Nagai Y, Watanabe T, et al. A nonclassical vitamin D receptor pathway suppresses renal fibrosis. *J Clin Invest.* 2013 Nov 1;123(11):4579-94.
115. Jacob A.I., Sallman A., Santiz Z., Hollis B.W.: Defective photoproduction of cholecalciferol in normal and uremic humans. *J. Nutr.* 1984; 114(7):1313-1319.
116. John, EM, Schwartz, GG, Koo, J, Van Den, BD & Ingles, SA (2005) Sun exposure, vitamin D receptor gene polymorphisms, and risk of advanced prostate cancer. *Cancer Res* 65, 5470–5479.
117. Jones G. Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1 $\alpha$ -hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3). *Semin Dial.* 2007;20(4):316-324
118. Judd SE, Tangpricha V. Vitamin D deficiency and risk for cardiovascular disease. *Am J Med Sci.* 2009 Jul; 338(1):40-4.
119. Kamei Y, Kawada T, Kazuki R, et al. (1993) Vitamin D receptor gene expression is up-regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 948–955.
120. Kandula P, Dobre M, Schold JD, Schreiber MJ Jr, Mehrotra R, Navaneethan SD. Vitamin D supplementation in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies and randomized controlled trials. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011 Jan; 6(1):50-62.
121. Karlsson C, Lindell K, Ottosson M, Sjostrom L, Carlsson B, Carlsson LM. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 3925–3929.
122. Kawashima H., Kraut J.A., Kurokawa K.: Metabolic acidosis suppresses 25-hydroxyvitamin in D3–1 $\alpha$ -hydroxylase in the rat kidney. Distinct site and mechanism of action. *J. Clin. Invest.* 1982; 70(1):135-140.
123. KDIGO Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder, *Kidney Int.* 2009; 76 (Suppl 113): S22-S49.

124. Keane WF, Eknoyan G. Proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, elimination (PARADE): a position paper of the National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis.* 1999; 33:1004–1010.
125. Kiberd B, Panek R. Cardiovascular outcomes in the outpatient kidney transplant clinic: The Framingham risk score revisited. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 822–828
126. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO Clinical Practice Guidelines: Care of Kidney Transplant Recipients *Am J Transplant.* 2009 Nov; 9 Suppl 3:S1-155.
127. Kitanaka S, Takeyama K, Murayama A, et al. Inactivating mutations in the human 25-hydroxyvitamin D3 1 $\alpha$ -hydroxylase gene in patients with pseudovitamin D-deficiency rickets. *N Engl J Med* 1998; 338:653-61.
128. Klinge CM, Bodenner DL, Desai D, Niles RM, Traish AM (May 1997). Binding of type II nuclear receptors and estrogen receptor to full and half-site estrogen response elements in vitro. *Nucleic Acids Res.* 25 (10): 1903–12
129. Knoll GA. Proteinuria in kidney transplant recipients: prevalence, prognosis, and evidence-based management. *Am J Kidney Dis.* 2009 Dec;54(6):1131-44.
130. Koike, M, Elstner, E, Campbell, MJ, Asou, H, Uskokovic, M, Tsuruoka, N & Koefler, HP (1997) 19-nor-hexafluoride analogue of vitamin D3: a novel class of potent inhibitors of proliferation of human breast cell lines. *Cancer Res* 57, 4545–4550.
131. Kong J & Li YC (2006) Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E916–E924.
132. Kozai M, Yamamoto H, Ishiguro M, Harada N, Masuda M, Kagawa T et al. Thyroid hormones decrease plasma 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D levels through transcriptional repression of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP27B1). *Endocrinology.* 2013 Feb; 154(2):609-22.
133. Laaksi I, et al. An association of serum vitamin D concentrations < 40 nmol/L with acute respiratory tract infection in young Finnish men. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86(3):714–7.
134. Lemire JM, Archer DC, Khulkarni A, Inca A, Uskokovic MR, Stepkowski S. Prolongation of the survival of murine cardiac allografts by the vitamin D3 analogue 1,25-dihydroxy-delta 16-cholecalciferol. *Transplantation* 54: 762–763, 1992.

135. Lemire JM, et al. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest.* 1984; 74(2):657–61.
136. Levin A., Bakris G.L., Molitch M., et al: Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: Results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int.* 2007; 71(1):31-38.
137. Li J, Brasier AR. Angiotensinogen gene activation by angiotensin II is mediated by the rel A (nuclear factor-kappaB p65) transcription factor: one mechanism for the renin-angiotensin system positive feedback loop in hepatocytes. *Mol Endocrinol.* 1996; 10: 252–264.
138. Li J, Byrne ME, Chang E, et al. (2008) 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D hydroxylase in adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 112, 122–126.
139. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 2002; 110: 229–238.[http://hyper.ahajournals.org/external-ref?access\\_num=10.1172/JCI200215219&link\\_type=DOI](http://hyper.ahajournals.org/external-ref?access_num=10.1172/JCI200215219&link_type=DOI)
140. Li YC, Qiao G, Uskokovic M, Xiang W, Zheng W, Kong J. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 89–90: 387–392.
141. Lips P, Hosking D, Lippuner K, et al. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. *J Intern Med* 2006;260:245-54.
142. Littorin B, et al. Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS) *Diabetologia.* 2006; 49(12):2847–52.
143. Liu PT, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006; 311(5768):1770–3.
144. Lo CW, Paris PW, Clemens TL, Nolan J, Holick MF. Vitamin D absorption in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption syndromes. *Am J Clin Nutr.* 1985;42:644-649.

145. London GM, Guérin AP, Verbeke FH, Pannier B, Boutouyrie P, Marchais SJ, Métivier F. Mineral metabolism and arterial functions in end-stage renal disease: potential role of 25-hydroxyvitamin D deficiency. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Feb; 18(2):613–20.
146. Looker AC, Dawson-Hughes B, Calvo MS et al (2002) Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal subpopulations from NHANES III. *Bone* 30:771–777.
147. Luscombe, CJ, French, ME, Liu, S, Saxby, MF, Jones, PW, Fryer, AA & Strange, RC (2001) Prostate cancer risk: associations with ultraviolet radiation, tyrosinase and melanocortin-1 receptor genotypes. *Br J Cancer* 85, 1504–1509.
148. M. Kajikawa, H. Ishida, S. Fujimoto, E. Mukai, M. Nishimura, J. Fujita, Y. Tsuura, Y. Okamoto, A. W. Norman, Y. Seino, An insulinotropic effect of vitamin D analog with increasing intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in pancreatic  $\beta$ - cells through nongenomic signal transduction. *Endocrinology* 140, 4706–4712 (1999).
149. Ma Y, Yu WD, Hershberger PA, Flynn G, Kong RX, Trump DL, Johnson CS. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> potentiates cisplatin antitumor activity by p73 induction in a squamous cell carcinoma model. *Mol Cancer Ther*. 2008 Sep; 7(9):3047–55.
150. MacLaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D<sub>3</sub>. *J Clin Invest*. 1985;76:1536-1538.
151. Maestro B, Campion J, Davila N et al. Stimulation by 1, 25- dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> of insulin receptor expression and insulin responsiveness for glucose transport in U-937 human promonocytic cells. *Endocr J* 2000; 47: 383–391.
152. Maestro B, Davila N, Carranza MC et al. Identification of a vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 84: 223–230.
153. Maislos M, Silver J, Fainaru MI. Intestinal absorption of vitamin D sterols: differential absorption into lymph and portal blood in the rat. *Gastroenterology* 1980;80:1528-34.
154. Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF. Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet*. 1998; 351(9105):805–806.

155. Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circulation research*. 2000; 87:214–220.
156. Marcén R, Ponte B, Rodríguez-Mendiola N, Fernández-Rodríguez A, Galeano C, Villafruela JJ, et al. Vitamin D deficiency in kidney transplant recipients: risk factors and effects of vitamin D3 supplements. *Transplant Proc*. 2009 Jul-Aug;41(6):2388-90.
157. Martin T, Cambell RK. Vitamin D and Diabetes. *Diabetes Spectrum Vol 24, Number 2*, 2011; 113-8.
158. Marwaha RK, Tandon N, Reddy D, et al. Vitamin D and bone mineral density status of healthy schoolchildren in northern India. *Am J Clin Nutr* 2005;82:477-82.
159. Mattner F, et al. Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) *Eur J Immunol*. 2000; 30(2):498–508.
160. McGrath J, Selten JP, Chant D. Longterm trends in sunshine duration and its association with schizophrenia birth rates and age at first registration — data from Australia and the Netherlands. *Schizophr Res* 2002;54:199-212.
161. McGrath JJ, Kimlin MG, Saha S, Eyles DW, Parisi AV. Vitamin D insufficiency in south-east Queensland. *Med J Aust* 2001; 174:150-1.
162. Melamed ML, Muntner P, Michos ED et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and the prevalence of peripheral arterial disease. Results from NHANES 2001 to 2004. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1179–1185
163. Merlino LA, et al. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women’s Health Study. *Arthritis Rheum*. 2004; 50(1):72–7.
164. Miller PD, Shane E. Management of Transplantation Renal Bone Disease: Interplay of Bone Mineral Density and Decisions Regarding Bisphosphonate Use. In: Weir MR, *Medical Management of Kidney Transplantation*, Philadelphia, USA, Lippincott, Williams & Wilkins, 2005: 359 - 73.
165. Mishal AA (2001) Effects of different dress styles on vitamin D levels in healthy young Jordanian women. *Osteoporos Int*12:931–935.

166. Miyaura, C, Abe, E, Kuribayashi, T, Tanaka, H, Konno, K, Nishii, Y & Suda, T (1981) 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induces differentiation of human myeloid leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 102, 937–943.
167. Mizobuchi M, Morrissey J, Finch JL, Martin DR, Liapis H, Akizawa T, Slatopolsky E. Combination therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a vitamin D analog suppresses the progression of renal insufficiency in uremic rats. *J Am Soc Nephrol* 18: 1796–1806, 2007.
168. Mizwicki MT, Norman AW. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci Signal*. 2009; 2: re4.
169. Moe SM, Sprague SM. Chronic Kidney Disease – Mineral Bone Disorder in: Brenner & Rector's *The Kidney*, 9<sup>th</sup> edition, Philadelphia, USA, Saunders Elsevier, 2012: 2029 – 2032.
170. Moffatt KA, Johannes WU, Miller GJ. 1Alpha,25dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and platinum drugs act synergistically to inhibit the growth of prostate cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 1999; 5:695–703.
171. Munger KL, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2006; 296(23):2832–8.
172. N. Sergeev, W. B. Rhoten, 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> evokes oscillations of intracellular calcium in a pancreatic  $\beta$ -cell line. *Endocrinology* 136, 2852–2861 (1995).
173. Nesby-O'Dell S, Scanlon KS, Cogswell ME, Gillespie C, Hollis BW, Looker AC, et al. Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Clin Nutr*. 2002 Jul;76(1):187-92.
174. Norman AW., Minireview: Vitamin D receptor: New assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147, 5542–5548 (2006).
175. O'Herrin JK, Hullett DA, Heisey DM, Sollinger HW, Becker BN. A retrospective evaluation of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its potential effects on renal allograft function. *Am J Nephrol* 22: 515–520, 2002.
176. Ochs-Balcom HM, Chennamaneni R, Millen AE, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with adiposity phenotypes. *Am J Clin Nutr* 93, 2011; 5–10.

177. Ojo AO. Cardiovascular complications after renal transplantation and their prevention. *Transplantation* 2006; 82: 603–611.
178. Ovesen L, Andersen R, Jakobsen J. Geographical differences in vitamin D status, with particular reference to European countries. *Proc Nutr Soc.* 2003 Nov; 62(4):813-21.
179. Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, et al. Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol.* 2001; 154:369–387.
180. Palmer, HG, Sanchez-Carbayo, M, Ordonez-Moran, P, Larriba, MJ, Cordon-Cardo, C & Munoz, A (2003) Genetic signatures of differentiation induced by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 63, 7799–7806.
181. Parekh D, Sarathi V, Shivane VK, Bandgar TR, Menon PS, Shah NS: Pilot study to evaluate the effect of short-term improvement in vitamin D status on glucose tolerance in patients with type 2 diabetes. *Endocr Pract* 16:600–608, 2010
182. Park JW, Bae EH, Kim IJ, et al. Paricalcitol attenuates cyclosporine-induced kidney injury in rats. *Kidney Int.* 2010;77:1076–1085.
183. Park JW, Bae EH, Kim IJ, et al. Renoprotective effects of paricalcitol on gentamicin-induced kidney injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010; 298:F301–F313.
184. Parker J, Hashmi O, Dutton D, Mavrodaris A, Stranges S, Kandala NB, Clarke A, Franco OH: Levels of vitamin D and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis. *Maturitas* 65: 225–236, 2010
185. Patel S, Farragher T, Berry J, Bunn D, Silman A, Symmons D. Association between serum vitamin D metabolite levels and disease activity in patients with early inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(7):2143–9.
186. Phillips S, Heuberger R. Metabolic disorders following kidney transplantation. *J Ren Nutr.* 2012 Sep;22(5):451-60.
187. Piemonti L, et al. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2000; 164(9):4443–51.
188. Pilz S, Dobnig H, Fischer JE et al. Low vitamin D levels predict stroke in patients referred to coronary angiography. *Stroke* 2008; 39: 2611–2613

189. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B: The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endo Metab* 92:2017–2029, 2007
190. Platz EA, Hankinson SE, Hollis BW, et al. Plasma 1,25-dihydroxy- and 25-hydroxyvitamin D and adenomatous polyps of the distal colorectum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9(10): 1059–1065.
191. Querings K, Girndt M, Geisel J, Georg T, Tilgen W, Reichrath J. 25-hydroxyvitamin D deficiency in renal transplant recipients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Feb;91(2):526-9.
192. Rahman A, Hershey S, Ahmed S, Nibbelink K, Simpson RU. Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007 Mar; 103(35):416–9.
193. Redaelli CA, Wagner M, Gunter-Duwe D, Tian YH, Stahel PF, Mazzucchelli L, Schmid RA, Schilling MK. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 shows strong and additive immunomodulatory effects with cyclosporine A in rat renal allotransplants. *Kidney Int* 61: 288–296, 2002.
194. Redaelli CA, Wagner M, Tien YH, Mazzucchelli L, Stahel PF, Schilling MK, Dufour JF. 1alpha,25-Dihydroxycholecalciferol reduces rejection and improves survival in rat liver allografts. *Hepatology* 34: 926–934, 2001.
195. Rifkin J: The role of vitamin D in diabetes. *Pract Diabetol* 28:5–8, 2009
196. Rodríguez M, Daniels B, Gunawardene S, Robbins GK. High frequency of vitamin D deficiency in ambulatory HIV-Positive patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009; 25(1):9–14.
197. Rojas-Rivera J, De La Piedra C, Ramos A, Ortiz A, Egido J. The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant.* 2010 Sep;25(9):2850-65.
198. Rucker D, Allan JA, Fick GH, Hanley DA. Vitamin D insufficiency in a population of healthy western Canadians [published correction appears in *CMAJ.* 2002;167:850]. *CMAJ.* 2002;166:1517-1524.

199. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, et al. Nephric is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:7962–7967.
200. Saenger AK, Laha TJ, Bremner DE et al. Quantification of serum 25-hydroxyvitamin D(2) and D(3) using HPLC-tandem mass spectrometry and examination of reference intervals for diagnosis of vitamin D deficiency. *Am J Clin Pathol* 2006; 125: 914–920.
201. Samaan F, Requião-Moura LR, Pinheiro HS, Ozaki KS, Saraiva Câmara NO, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pacheco-Silva%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=21911128](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pacheco-Silva%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21911128) et al. Prevalence and progression of chronic kidney disease after renal transplantation. *Transplant Proc*. 2011 Sep;43(7):2587-91.
202. Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2006 Apr; 83(4):754–9.
203. Schwartz, GG & Hulka, BS (1990) Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis). *Anticancer Res* 10, 1307–1311.
204. Scragg R, Sowers MF, Bell C: Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care* 27:2813– 2818, 2004
205. Sedrani SH. Low 25-hydroxyvitamin D and normal serum calcium concentrations in Saudi Arabia: Riyadh region. *Ann Nutr Metab* 1984;28:181-5.
206. Self TH, Chrisman CR, Baciewicz AM, Bronze MS. Isoniazid drug and food interactions. *Am J Med Sci*. 1999 May;317(5):304-11.
207. Shah S, Islam MN, Dakshanamurthy S, et al. The molecular basis of vitamin D receptor and beta-catenin crossregulation. *Mol Cell*. 2006; 21:799–809.
208. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 2004;19:429-35.

209. Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, et al. Vitamin D receptor independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289(5):F1088-F1095.
210. Simpson RU, Hershey SH, Nibbelink KA. Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 Mar;103(35):521–4.
211. Smolders J, Menheere P, Kessels A, Damoiseaux J, Hupperts R. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008; 14(9):1220–4.
212. Snijder MB, van Dam RM, Visser M et al (2005) Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4119–4123
213. Srinivas TR, Meier-Kriesche HU. Obesity and kidney transplantation. *Contrib Nephrol*. 2006;151:19-41.
214. Sugden JA, Davies JI, Witham MD, Morris AD, Struthers AD. Vitamin D improves endothelial function in patients with Type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabet Med*. 2008 Mar; 25(3):320–5.
215. Sullivan SS, Rosen CJ, Halteman WA, Chen TC, Holick MF. Adolescent girls in Maine at risk for vitamin D insufficiency. *J Am Diet Assoc* 2005;105:971-4.
216. Sun J, Kong J, Duan Y, et al. Increased NF- $\kappa$ B activity in fibroblasts lacking the vitamin D receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291:E315–E322.
217. Szeles L, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is an autonomous regulator of the transcriptional changes leading to a tolerogenic dendritic cell phenotype. *J Immunol*. 2009; 182(4):2074–83.
218. Taha SA, Dost SM, Sedrani SH. 25-Hydroxyvitamin D and total calcium: extraordinarily low plasma concentrations in Saudi mothers and their neonates. *Pediatr Res*. 1984;18:739-741.
219. Takano Y, Yamauchi K, Hiramatsu N, et al. Recovery and maintenance of nephrin expression in cultured podocytes and identification of HGF as a repressor of nephrin. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292:F1573–F1582.

220. Tan X, Wen X, Liu Y. Paricalcitol inhibits renal inflammation by promoting vitamin D receptor-mediated sequestration of NF-kappaB signaling. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19:1741–1752.
221. Tang J, et al. Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response. *J Immunol.* 2009; 182(8):4624–32.
222. Tangpricha V, Flanagan JN, Whitlatch LW, et al. 25-hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylase in normal and malignant colon tissue. *Lancet* 2001; 357:1673–4.
223. Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC, Holick MF. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *Am J Med.* 2002;112:659-662.
224. The Endocrine Society. Evaluation, treatment and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine society practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* July 2011, 96(7): 1911–1930.
225. Thompson GR. Absorption of fat soluble vitamins and sterols. *J Clin Pathol* 1971;24(suppl 5):85-9.
226. Thorne J, Campbell MJ. The vitamin D receptor in cancer. *Proc Nutr Soc.* 2008 May; 67(2):115-27.
227. Tishkoff DX, Nibelink KA, Holmberg KH, Dandu L, Simpson RU. Functional vitamin D receptor (VDR) in the t-tubules of cardiac myocytes: VDR knockout cardiomyocyte contractility. *Endocrinology.* 2008 Feb; 149(2):558–64.
228. Tsugawa N, Suhara Y, Kamao M et al. Determination of 25-hydroxyvitamin D in human plasma using high-performance liquid chromatography– tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2005; 77: 3001–3007.
229. van Dam RM, Snijder MB, Dekker JM et al (2007) Potentially modifiable determinants of vitamin D status in an older population in the Netherlands: the Hoorn Study. *Am J Clin Nutr*85:755–761
230. van der Meer IM, Karamali NS, Boeke AJP et al (2006) High prevalence of vitamin D deficiency in pregnant non-Western women in The Hague, Netherlands. *Am J Clin Nutr* 84:350–353.
231. van Hoof HJ, de Sevaux RG, van Baelen H, et al. Relationship between free and total 1,25-dihydroxyvitamin D in conditions of modified binding. *Eur J Endocrinol.* 2001; 144(4):391-396.

232. Vanholder R., Patel S., Hsu C.H.: Effect of uric acid on plasma levels of 1,25(OH)2D in renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1993; 4(4):1035-1038.
233. Villamor E. A potential role for vitamin D on HIV infection? *Nutr Rev.* 2006; 64(5 Pt 1):226–33.
234. Von Hurst PR, Sonehouse W, Coad J: Vitamin D supplementation reduces insulin resistance in South Asian women living in New Zealand who are insulin resistant and vitamin D deficient: a randomized, placebo-controlled trial. *Br J Nutr* 103:549–555, 2010
235. Wang TJ, Penina MJ, Booth SL et al. Vitamin D and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008; 117: 503–511
236. Wang TT, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol.* 2004;173(5):2909–12.
237. Williams C. On the use and administration of cod-liver oil in pulmonary consumption. *London Journal of Medicine.* 1849;1:1–18.
238. Wolf M., Shah A., Gutierrez O., et al: Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2007; 72(8):1004-1013.
239. Wong KE, Kong J, Zhang W, et al. (2011) Targeted expression of human vitamin D receptor in adipocytes decreases energy expenditure and induces obesity in mice. *J Biol Chem* 286, 33804–33810.
240. Woodward RS, Schnitzler MA, Baty J et al. Incidence and cost of new onset diabetes mellitus among U.S. wait-listed and transplanted renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2003; 3: 590–598.
241. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity [published correction appears in *Am J Clin Nutr.* 2003; 77:1342]. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:690-693.
242. Xiong M, Gong J, Liu Y, Xiang R, Tan X. Loss of vitamin D receptor in chronic kidney disease: a potential mechanism linking inflammation to epithelial-to-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Oct;303(7):F1107-15.
243. Zehnder D, Bland R, Williams MC, McNinch RW, Howie AJ, Stewart PM, Hewison M. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Feb; 86(2):888-94.

244. Zehnder D, Quinkler M, Eardley KS, et al. Reduction of the vitamin D hormonal system in kidney disease is associated with increased renal inflammation. *Kidney Int.* 2008; 74:1343–1353.
245. Zella LA, Shevde NK, Hollis BW, et al. Vitamin D-binding protein influences total circulating levels of 1,25-dihydroxyvitamin D3 but does not directly modulate the bioactive levels of the hormone in vivo. *Endocrinology.* 2008; 149(7):3656–3567.
246. Zhang Z, Yuan W, Sun L, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) targeting of NF-kappaB suppresses high glucose-induced MCP-1 expression in mesangial cells. *Kidney Int.* 2007; 72:193–201.
247. Zhang Z, Zhang Y, Ning G, Deb DK, Kong J, Li YC. Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: blockade of compensatory renin increase. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 15896–15901, 2008.
248. Zhang Z, Zhang Y, Ning G, et al. Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: blockade of compensatory renin increase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:15896–15901.
249. Zhou C, Lu F, Cao K, Xu D, Goltzman D, Miao D. Calcium-independent and 1,25(OH)2D3-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1 $\alpha$ -hydroxylase knockout mice. *Kidney Int.* 2008; 74: 170–179.
250. Zipitis CS, Akobeng AK: Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child* 93:512–517, 2008
251. Zold E, Szodoray P, Gaal J, Kappelmayer J, Csathy L, Gyimesi E et al. Vitamin D deficiency in undifferentiated connective tissue disease. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10(5):R123.