

Lek. Joanna Wilimborek

"Zmienność stężenia aktywnych metabolitów witaminy D
w zależności od pory roku, stanu odżywienia
oraz wskaźników uszkodzenia przeszczepionego narządu
u pacjentów w odległym okresie po przeszczepieniu nerki"

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. prof. UM Ilona Kurnatowska

Klinika Chorób Wewnętrznych i Nefrologii Transplantacyjnej,
I Katedra Chorób Wewnętrznych UM w Łodzi

Łódź, 2020

Streszczenie

Wstęp

Witamina D odgrywa podstawową rolę w regulacji metabolizmu kości oraz gospodarki wapniowo-fosforanowej. Odkrycie receptora dla tej witaminy, występującego na powierzchni większości ludzkich komórek pozaszkieletowych uwidoczniało jej wielokierunkowe działanie wpływające na czynność wielu tkanek i narządów, m.in. na funkcję układu immunologicznego, krwiotwórczego, nowotworzenie oraz morfologię i czynność układu sercowo-naczyniowego. Powstanie aktywnie czynnych metabolitów witaminy D wymaga dwuetapowego procesu, w którym zarówno ergokalcyferol, dostarczany jako składnik pokarmów roślinnych jak i cholekalcyferol, powstający w skórze pod wpływem promieni ultrafioletowych podlegają dalszym przemianom. W wątrobie obydwa te związki ulegają 25-hydroksylacji, w wyniku której powstają odpowiednio 25-hydroksycholekalcyferol (25(OH)D) i 25-hydroksyergokalcyferol, a następnie w nerkach 1 α -hydroksylacji, której metabolitami są 1,25-dihydroksyergokalcyferol oraz bardziej aktywny metabolicznie 1,25(OH)₂D (kalcytriol). U chorych z przewlekłą chorobą nerek (PChN), niedobór witaminy D jest stwierdzany już we wczesnych stadiach choroby. Jest on następstwem ubytku czynnego miąższu nerek prowadzącego do zmniejszonego przekształcania 25(OH)D do 1,25(OH)₂D, ale także może być wynikiem licznych obciążeń oraz ograniczeń, w tym dietetycznych, zalecanych pacjentom z PChN. Pacjenci po przeszczepieniu nerki (KTx) stanowią grupę osób szczególnie narażonych na niedobory witaminy D. Większość osób po przeszczepieniu nerki ma już wyjściowo upośledzoną czynność nerki, pacjenci przyjmują leki immunosupresyjne w tym glikokortykosteroidy oraz inhibitory kalcyneuryny, mają zalecaną zmniejszoną ekspozycję na światło słoneczne ze względu na duże ryzyko rozwoju nowotworów skóry. Pojedyncze doniesienia wykazują, iż witamina D może wpływać na czynność nerki przeszczepionej, wywierać korzystny wpływ na liczne zaburzenia metaboliczne występujące u chorych po KTx w tym profil lipidowy, zmniejszać ryzyko rozwoju cukrzycy, a także modyfikować przebieg procesów zapalnych. Z drugiej jednak strony wykazano, że zarówno zbyt małe jak i zbyt duże stężenie tej witaminy mogą być związane z występowaniem zwapnień naczyniowych (zjawisko krzywej U) oraz ogólnie większym ryzykiem sercowo-naczyniowym włącznie z ryzykiem zgonu. W chwili obecnej brak jest wytycznych dotyczących oceny zasobów witaminy D, a także jej suplementacji u pacjentów po przeszczepieniu nerki.

Celem pracy była:

1. Ocena stężenia aktywnych metabolitów witaminy D w surowicy oraz ich zmienności w zależności od pory roku u pacjentów ze stabilną czynnością nerki przeszczepionej w odległym okresie po przeszczepieniu nerki.
2. Ocena wpływu stężenia aktywnych metabolitów witaminy D na wskaźniki uszkodzenia nerki przeszczepionej, profil lipidowy oraz parametry stanu zapalnego.
3. Ocena wpływu stanu odżywienia pacjentów po przeszczepieniu nerki na stężenie aktywnych metabolitów witaminy D.

Pacjenci i metody

Przeprowadzono prospektywne, obserwacyjne badanie wśród pacjentów będących w odległym okresie po KTx, mieszkających w Polsce (54°50' N, 49°00' E), pozostających pod stałą opieką Poradni Leczenia Po Przeszczepieniu Nerki USK nr 1 im. N. Barlickiego w Łodzi. Do badania wstępnie, w okresie letnim zakwalifikowano 105 pacjentów (42 K, 63 M; średni wiek 49,33±12,17lat), jednakże ze względu na to, iż część osób nie zgłosiła się na kontrolną wizytę w miesiącach zimowych, miała aktywne zakażenie lub rozpoczęła suplementację preparatami wapnia/witaminy D, ostatecznej analizie poddano dane kliniczne i wyniki uzyskane od 64 biorców. Pacjenci po wyrażeniu i podpisaniu świadomej zgody, podczas rutynowej wizyty w Poradni mieli oznaczone wskaźniki biochemiczne (stężenie kreatyniny, albuminy, białka całkowitego, glukozy, CRP, cholesterolu całkowitego (TC), HDL-cholesterolu, trójglicerydów (TG), (frakcję LDL-cholesterolu obliczono używając wzoru Friedewalda), parametry gospodarki wapniowo-fosforanowej: stężenie parathormonu, wapnia i fosforu, morfologię krwi oraz stężenie takrolimusu (TAC)/cyklosporyny (CsA) przed kolejną dawką leku. W tym samym dniu pobrano również krew, odwirowano i zamrożono surowicę w -80°C w celu oceny stężenia: 25(OH)D, kalcytriolu, czynnika FGF-23. W dniu wizyty oznaczono również ilość wydalanego białka (wskaźnik ACR: albumina/kreatynina) w pierwszej porannej zbiorce moczu. Czynność nerek określano za pomocą oceny filtracji kłębuszkowej (eGFR) wyliczanej na podstawie uproszczonego wzoru MDRD. Podczas tej samej wizyty dokonano pomiarów antropometrycznych: wzrost, masa ciała, oraz wykonano analizę składu ciała za pomocą bioimpedancji elektrycznej BCM (body composition monitoring). Pierwsza część badania była przeprowadzona w miesiącach letnich (lipiec, sierpień). Te same procedury zostały powtórzone w miesiącach zimowych (styczeń, luty). Dane dotyczące historii choroby, stosowanego leczenia w tym leczenia immunosupresyjnego zaczerpnięto z dokumentacji medycznej pacjenta. Na przeprowadzenie

badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej UM w Łodzi (nr uchwały RNN/1/14/KE z dn. 14.01.2014 r.).

Wyniki

Całościowej ocenie poddano wyniki pochodzące od 26 kobiet (średnia wieku: $48,5 \pm 12,7$ lat) i 38 mężczyzn (średnia wieku $49,9 \pm 12,0$ lat); pacjenci byli średnio $5,6 \pm 2,7$ lat po KTx, ze średnim eGFR $51,59 \pm 13,13$ ml/min/1,73m². Średnie roczne stężenie 25(OH)D wynosiło $18,76 \pm 6,32$ ng/ml, natomiast 1,25(OH)₂D $86,65 \pm 18$ pg/ml. Stężenie 25(OH)D oceniane latem było istotnie statystycznie większe niż zimą: $20,3 \pm 7,4$ vs $17,22 \pm 7,1$ ng/ml; $p < 0,001$, tak jak i kalcytriolu: $110,73 \pm 31,83$ vs $63,4 \pm 14,62$ pg/ml; $p < 0,001$. Nie wykazano wzajemnej zależności stężeń 25(OH)D oraz 1,25(OH)₂D ($r = -0,22$; $p = 0,076$). Na podstawie stężenia 25(OH)D i norm ustalonych dla populacji ogólnej u większości biorców stwierdzono hipowitaminozę, bowiem większość pacjentów miała stężenie 25(OH)D ≤ 30 ng/ml (93,8%, $n = 60$). U żadnego pacjenta nie rozpoznano ciężkiego niedoboru witaminy D (25(OH)D < 5 ng/ml). Te same zależności występowały zarówno zimą jak i latem. Następnie oceniając wpływ stężenia obu aktywnych metabolitów witaminy D na wskaźniki uszkodzenia nerki przeszczepionej, nie stwierdzono statystycznie istotnych zależności pomiędzy stężeniem 25(OH)D, a odpowiednio: stężeniem kreatyniny ($r = -0,07$; $p = 0,598$) oraz eGFR ($r = 0,11$; $p = 0,376$). Podobnie nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniem 1,25(OH)₂D, a stężeniem kreatyniny ($r = 0,00$; $p = 0,981$) i eGFR ($r = 0,00$; $p = 0,975$). Czynność nerki przeszczepionej nie znalazła się wśród czynników mających wpływ na stężenie 25(OH)D w zbudowanym modelu regresji liniowej. Jednakże, przyglądając się poszczególnym grupom badanych, podzielonych według niewystarczającego stężenia, niedoboru i prawidłowych zasobów witaminy D (wg. KDIGO), zauważono (nie wykazano jednak istotności statystycznej), że wraz ze zwiększającymi się zasobami witaminy D, pacjenci mieli lepszą funkcję nerki. Ponadto prawidłowe zasoby witaminy D stwierdzono tylko u pacjentów z eGFR ≥ 45 ml/min/1,73m². Nie zaobserwowano związku między czasem który upłynął od przeszczepienia nerki, a stężeniem 25(OH)D ($r = -0,06$, $p = 0,636$) i 1,25(OH)₂D ($r = -0,04$, $p = 0,786$). Choć zwracało uwagę (bez istotności statystycznej), że wraz z upływem czasu po KTx obserwowano zmniejszenie się stężenia 25(OH)D. Jednak w modelu regresji liniowej upływu czasu od KTx był jednym z czynników wpływających na stężenie 25(OH)D.

W wyniku przeprowadzonej analizy, nie stwierdzono także zależności pomiędzy nasileniem białkomoczu ocenianym na podstawie wskaźnika ACR i odpowiednio stężeniami 25(OH)D

($r=-0,11$, $p=0,408$) oraz $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ($r=0,08$; $p=0,547$). Ponadto, nie wykazano różnicy stężeń $25(\text{OH})\text{D}$ oraz $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ u biorców z i bez białkomoczu. Natomiast ACR był niemal trzykrotnie mniejszy u osób z $25(\text{OH})\text{D} >30$ ng/ml niż u osób ze stężeniem <15 ng/ml, nie wykazano jednak zależności statystycznej. Ponadto, wśród pacjentów z białkomoczem, u wszystkich stwierdzano niedobór witaminy D, zaś prawidłowe stężenie $25(\text{OH})\text{D}$ tylko wśród biorców bez białkomoczu. Nie wykazano także, zależności między stężeniem CRP, a $25(\text{OH})\text{D}$ ($r=-0,15$, $p=0,351$) oraz stężeniem kalcytriolu ($r=-0,01$, $p=0,974$). Nie wykazano również, aby pacjenci z hipowitaminozą D mieli większe stężenie tego wskaźnika ostrej fazy. Chociaż w przeprowadzonej analizie regresji liniowej białko CRP znalazło się wśród czynników wpływających na stężenie $25(\text{OH})\text{D}$.

Analizując skład ciała pacjentów nie zaobserwowano istotnego związku pomiędzy stężeniem $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ i $25(\text{OH})\text{D}$, a BMI (choć BMI znalazło się jako jeden z czynników wpływających na stężenie $25(\text{OH})\text{D}$ w modelu regresji), oraz masą ciała. Stan odżywienia określony na podstawie BMI nie różnił się istotnie u pacjentów z prawidłowymi stężeniami $25(\text{OH})\text{D}$ oraz ze stwierdzonym niedoborem witaminy D. Obserwowano tendencję do zmniejszania się stężenia $25(\text{OH})\text{D}$ wraz ze zwiększaniem BMI. W przeprowadzonym badaniu wykazano, że u pacjentów po przeszczepieniu, wraz ze zwiększeniem zawartości tkanki tłuszczowej oraz zmniejszeniem beztłuszczowej, zmniejsza się stężenie $25(\text{OH})\text{D}$, natomiast skład ciała nie wpływał na stężenie kalcytriolu. Na stężenie ocenianych metabolitów nie miała również wpływu zawartość wody w ustroju, choć wykazano większą zawartość wody wewnątrzkomórkowej u pacjentów z większym stężeniem $25(\text{OH})\text{D}$. U pacjentów z prawidłowym stężeniem $25(\text{OH})\text{D}$ stwierdzono mniejsze stężenie TC niż u pacjentów z hipowitaminozą ($171,63 \pm 34,87$ mg/dl vs $216,03 \pm 39,61$ mg/dl; $p=0,033$) oraz mniejsze stężenie TG ($104,00 \pm 30,84$ vs $166,71 \pm 71,05$ mg/dl; $p=0,046$). W analizie korelacji wykazano poprawę profilu lipidowego wraz ze zwiększeniem stężenia $25(\text{OH})\text{D}$: zmniejszenie stężenia TC ($r=-0,31$; $p=0,012$) oraz LDL-cholesterolu ($r=-0,25$; $p=0,049$). Stężenie TC okazało się być jednym z czynników wpływających na stężenie $25(\text{OH})\text{D}$ (analiza regresji liniowej). Nie stwierdzono wpływu stężenia kalcytriolu na oceniane parametry lipidowe.

Wnioski

1. Większość pacjentów w odległym okresie po przeszczepieniu nerki, niezależnie od pory roku ma niedostateczne zasoby witaminy D oceniane na podstawie stężenia 25(OH)D.
2. Stężenie aktywnych metabolitów witaminy D: 25(OH)D oraz 1,25(OH)₂D nie zależy od czynności nerki przeszczepionej ani nasilenia białkomoczu.
3. Nadmiar tkanki tłuszczowej oraz większe stężenie cholesterolu są czynnikami ryzyka niedoboru witaminy D u pacjentów w odległym okresie po przeszczepieniu nerki.

Summary

Introduction

Vitamin D plays a fundamental role in the regulation of bone metabolism and calcium-phosphate metabolism. Detection of a Vitamin D receptor which can be found on the surface of most human extraskeletal cells, revealed its multidirectional action affecting the function of many tissues and organs, including the immune system, haematopoietic system, carcinogenesis and the morphology and function of the cardiovascular system. The formation of active vitamin D metabolites require a two-stage process in which both the ergocalciferol supplied as an ingredient of plant foods and cholecalciferol, formed in the skin under the influence of ultraviolet rays, undergo further transformation. In the liver, both of these compounds undergo 25-hydroxylation, resulting in 25-hydroxycholecalciferol (25(OH)D) and 25-hydroxyergocalciferol respectively, followed by 1 α -hydroxylation in the kidneys, the metabolites of which are 1,25-dihydroxyergocalciferol and more metabolically active 1,25(OH)₂D (calcitriol). In patients with chronic kidney disease (CKD), vitamin D deficiency appears in early stages of the disease. It is a consequence of the active loss of renal parenchyma leading to a reduced conversion of 25(OH)D to 1,25(OH)₂D, but may also be the result of numerous burdens and restrictions, including dietary ones, recommended for patients with CKD. Kidney transplant patients (KTx) are exposed to vitamin D deficiency. Most of the kidney transplant patients already have an initial impairment of kidney function, patients are taking immunosuppressive drugs including glucocorticosteroids and calcineurin inhibitors, and have a reduced exposure to sunlight due to high risk of developing skin cancer. Individual reports show that vitamin D may affect the function of the transplanted kidney, has a beneficial effect on numerous metabolic disorders in patients after KTx, including lipid profile, reduced risk of diabetes development and can modify the course of inflammatory processes. On the other hand, it has been shown that both too low and too high concentration of this vitamin can be associated with vascular calcification (U-curve phenomenon) and generally higher cardiovascular risk including risk of death. Currently, there are no guidelines for assessing vitamin D resources, as well as vitamin D supplementation in patients after kidney transplantation.

The aim of this study was:

1. The evaluation of the serum concentration of active vitamin D metabolites and their variability depending on the season of the year in patients with stable kidney graft function in long term after transplantation.
2. The evaluation of the influence of active vitamin D metabolites concentration on the indicators of transplanted kidney damage, lipid profile and inflammation parameters in patients in long term after kidney transplantation.
3. The evaluation of the influence of nutritional status on active vitamin D metabolites concentration in patients in long term after kidney transplantation.

Patients and methods

A single center, prospective, observational study was conducted among patients in the distant period after KTx, living in Poland (54°50 'N, 49°00'E), who are under the care of Outpatient Post-transplant Clinic in Barlicki Hospital in Lodz. 105 patients (42 K, 63 M; mean age 49.33 ± 12.17 years) were initially qualified for the study, however, due to the fact that some people did not report for a follow-up visit in the winter months, had an active infection or started calcium / vitamin D supplementation, clinical data and results obtained from 64 recipients were finally analyzed. The study was initiated after the approval of the protocol by the local Ethics Committee and an informed consent was obtained from each patient before the start of any study procedures. Fasting blood samples like biochemical indicators (serum creatinine, albumin, total protein, glucose, CRP, total cholesterol (TC), HDL-cholesterol, triglycerides (TG), (LDL-cholesterol calculated using the Friedewald formula), parameters of calcium-phosphate metabolism: level of parathyroid hormone, calcium and phosphorus, blood count and concentration of tacrolimus (TAC) /cyclosporine (CsA) before the next dose of the drug were collected during routine ambulatory visits. On the same day blood was also collected, the serum was centrifuged and frozen at -80°C to assess the concentration of: 25(OH)D, calcitriol, FGF-23 factor. On the day of the visit the amount of protein excreted in the first morning urine collection (ACR: albumin/creatinine) was also determined. Graft function was determined by assessing glomerular filtration rate (eGFR) calculated on the basis of a simplified MDRD formula. During the same visit, anthropometric measurements like height and weight were taken, and body composition analysis was performed using electrical bioimpedance BCM (body composition monitoring). The first part of the study was conducted in the summer months (July and August). The same procedures were repeated in the winter months (January and February). Data on the history of the disease, the treatment used

including immunosuppressive therapy was taken from the patient's medical records. The study was approved by the Bioethical Commission of the Medical University of Lodz (resolution no. RNN / 1/14 / EC of 14.01.2014).

Results

The results from 26 women (mean age: 48.5 ± 12.7 years) and 38 men (mean age 49.9 ± 12.0 years) were subjected to a comprehensive assessment; patients were on average 5.6 ± 2.7 years after KTx, with mean eGFR 51.59 ± 13.13 ml/min/1.73m².

The mean annual concentration of 25(OH)D was 18.76 ± 6.32 ng/ml, while 1.25(OH)₂D was 86.65 ± 18 pg/ml. The level of 25(OH)D was significantly higher in the summer than in the winter: 20.3 ± 7.4 vs 17.22 ± 7.1 ng/ml; $p < 0.001$, as well as calcitriol: 110.73 ± 31.83 vs 63.4 ± 14.62 pg/ml; $p < 0.001$. Relationship between 25(OH)D and 1.25(OH)₂D level ($r = -0.22$; $p = 0.076$) was not found. Based on the 25(OH)D concentration and norms established for the general population, most recipients were found to have hypovitaminosis with 25(OH) D ≤ 30 ng/ml (93.8%, $n = 60$). No one had severe vitamin D deficiency (25(OH)D < 5 ng/ml). The same relationships occurred both in winter and summer. No statistically significant correlation was found between the level of 25(OH)D and serum creatinine ($r = -0.07$; $p = 0.598$) and eGFR ($r = 0.11$; $p = 0.376$). Similarly, no relationship was found between 1.25(OH)₂D and creatinine level ($r = 0.00$; $p = 0.981$) or eGFR ($r = 0.00$; $p = 0.975$). Graft function was not a factor affecting 25(OH)D level in the linear regression model. However, looking at individual groups of patients, divided according to insufficient concentration, deficiency and normal vitamin D resources (according to KDIGO), it was noticed (however, no statistical significance was shown) that, as the vitamin D resources increased, patients had better kidney function. In addition, normal vitamin D levels were found only in patients with eGFR ≥ 45 ml/min/1.73m². No relationship was observed between the time since KTx and the level of 25(OH)D ($r = -0.06$, $p = 0.636$) and 1.25(OH)₂D ($r = -0.04$, $p = 0.786$). Decrease in 25(OH)D level with time after KTx was observed, but no statistical significance was found. However, in the linear regression model, the passage of time since KTx was one of the factors affecting the 25(OH)D level. There was no relationship between proteinuria, assessed on the basis of the ACR index, and 25(OH)D ($r = -0.11$, $p = 0.408$) and 1.25(OH)₂D ($r = 0.08$; $p = 0.547$). In addition, there was no difference in the level of 25(OH)D and 1.25(OH)₂D in recipients with and without proteinuria, but ACR was almost three times lower in patients with 25(OH)D > 30 ng/ml than with 25(OH)D < 15

ng/ml, but no statistical relationship was found. In addition, vitamin D deficiency was found in all patients with proteinuria, while normal 25(OH)D levels were found only in recipients without proteinuria. No relationship was found between CRP and 25(OH)D ($r=-0.15$, $p=0.351$) and calcitriol ($r=-0.01$, $p=0.974$). Patients with Vitamin D hypovitaminosis did not have higher level of this acute phase marker, although in the linear regression analysis, CRP was one of the factors influencing 25(OH)D level. No significant relationship was observed between 1.25(OH)₂D and 25(OH)D levels, and BMI or body mass, although BMI was found to be one of the factors affecting 25(OH)D in the linear regression model. The patients' nutritional status determined on the basis of the BMI body mass index did not differ significantly in patients with normal 25(OH)D level and with known vitamin D deficiency. A tendency to decrease in 25(OH)D concentration with increasing BMI was observed. The study showed that in transplant patients, along with an increase in body fat and a decrease in lean body mass, 25(OH)D level decreases, while body composition did not affect calcitriol level. The concentration of evaluated metabolites was also not affected by the water content in the body, although a higher intracellular water content was found in patients with a higher 25(OH)D level. Patients with normal 25(OH)D level had lower TC level than patients with hypovitaminosis (171.63 ± 34.87 vs 216.03 ± 39.61 mg/dl; $p=0.033$) and lower TG concentration (104.00 ± 30.84 vs 166.71 ± 71.05 mg/dl; $p=0.046$). The improvement in the lipid profile with an increase in the level of 25(OH)D was noticed: the negative correlation between 25(OH)D and TC ($r=-0.31$; $p=0.012$) and LDL-cholesterol ($r=-0.25$; $p=0.049$) were found. The TC concentration proved to be one of the factors affecting 25(OH)D concentration in linear regression analysis. There was no effect of calcitriol level on the assessed lipid parameters.

Conclusions

1. Regardless of the season, most patients in long term after kidney transplantation have vitamin D deficiency based on 25(OH)D level.
2. Graft function and proteinuria do not affect the level of vitamin D active metabolites: 25(OH)D and 1.25(OH)₂D.
3. Excess of body fat and increased cholesterol level are risk factors for vitamin D deficiency in patients in long term after kidney transplantation.