

Účinek konverze z cyklosporinu na tacrolimus na endoteliální progenitorové buňky u dlouhodobě stabilních příjemců transplantované ledviny

Riegersperger M, Plischke M, Steiner S, Seidinger D, Sengoelge G, Winkelmayr WC, Sunder-Plassmann G. Effect of conversion from ciclosporin to tacrolimus on endothelial progenitor cells in stable long-term kidney transplant recipients. *Transplantation* 2013;95:1338–1345.

Endoteliální progenitorové buňky (EPC) jsou atrahovány z kostní dřeně a mohou se měnit v buňky endoteliální. Hrají potenciálně významnou roli v úpravách endotelu po ischemickém poškození a při neovaskularizaci. Počet EPC představuje z tohoto aspektu významný marker funkce cévní stěny a kardiovaskulárního rizika u nemocných s ICHS. Uvolnění z kostní dřeně je ovlivňováno stimulatory a inhibitory, dále věkem, kouřením, hypertenzí, diabetem a hyperlipidemií a také chronickým onemocněním ledvin, které počty EPC snižují. Na druhé straně k mobilizaci počtu EPC mohou vést statiny, inhibitory ACE či blokátory receptorů AT₁ pro angiotensin II (ARB), podávání ESA a také aktivní pohyb.

Předpokládá se, že spolu s hypertenzí, diabetem, hyperlipidemií, kouřením, zvýšenými hodnotami CRP, homocysteinu, lipoproteinu(a) a renální insuficiencí představuje snížený počet EPC významně negativní faktor kardiovaskulární mortality též u nemocných po transplantaci (Tx) ledviny. Po úspěšné Tx ledviny se funkce EPC většinou zlepšuje a hodnoty EPC se mohou blížit hodnotám u zdravých osob; jejich počet je úzce spojen s funkcí transplantované ledviny a při jejím snížení EPC klesají. Významnou roli z tohoto hlediska může hrát i dlouhodobá imunosupresivní léčba a její změny.

V experimentálních studiích bylo prokázáno, že cyklosporin A (CyA) může redukovat počet a funkci EPC a že účinek tacrolimu (Tac) byl spojen se zvýšeným krevním tlakem a koncentrací lipidů (což by mohlo také vést ke snížení počtu EPC). Není tedy zřejmé, zda počty a funkce EPC u nemocných po Tx ledviny léčených Tac by mohly být rozdílné ve srovnání s léčbou CyA.

K objasnění této otázky byla provedena prospektivní randomizovaná studie, která sledovala hypotézu, zda a jak může změna imunosupresivního režimu z CyA na Tac ovlivnit počty a funkci EPC. Z celkového počtu 583 pacientů po úspěšné Tx ledviny na vídeňské III. interní klinice iničiálně léčených cyklosporinem bylo vybráno k dlouhodobému sledování funkce EPC 148 nemocných, z nichž 100 bylo randomizováno pro léčbu tacrolimem a 48 cyklosporinem. Dvouleté sledování dokončilo celkem 141 nemocných (96 na tacrolimu, 45 na cyklosporinu), 33 % bylo žen. Průměrný věk nemocných byl 55,6 roku a průměrná odhadnutá glomerulární filtrace (eGF) činila 46,0 ml/min/1,73 m². Ve sledované cyklosporinové skupině

dostávalo 49 % nemocných statiny, ve skupině tacrolimové 53 %. Substituci ESA dostávalo 20 % nemocných s cyklosporinem a 21 % s tacrolimem. Také hladiny obou imunosupresiv byly dlouhodobě v rozmezí doporučených hodnot a funkce transplantované ledviny byla stabilní. Konverze z cyklosporinu na tacrolimus byla spojena s potenciálně vyšším kardiovaskulárním rizikem z hlediska krevního tlaku a lipidů, změny však nebyly signifikantní. Obě sledované skupiny se nelišily ani v hodnotách glykémie a glykovaného hemoglobinu, a to jak na začátku, tak po 24 měsících sledování.

Medián (mezikvartilový rozptyl) počtu EPC (definovaných jako CD34⁺/KDR⁺) při porovnání hodnot měřených za 3, 12 a 24 měsíců byl 6 (2–9), 3 (1–8), 2 (1–6), 3 (1–9) buněk na 5 × 10⁴ mononukleárních buněk u transplantovaných pacientů léčených cyklosporinem a 4 (2–8), 4 (1–11), 2 (1–5), 2 (0–5) u pacientů léčených tacrolimem. Nebyly rovněž zjištěny rozdíly ve sledování cirkulujících angiogenních buněk (CAC), ani žádné významné změny při jejich dlouhodobém sledování. Signifikantní změny spojené s poklesem endoteliálních buněk tvořících kolonie (cell colony-forming units, CFU-EC) byly zjištěny u nemocných léčených tacrolimem (p = 0,003).

Na základě těchto nálezů lze uzavřít, že konverze imunosupresivní léčby z cyklosporinu na tacrolimus nebyla spojena se zlepšeným účinkem na EPC. Současně prokázané nízké hodnoty EPC představují zvýšené riziko následných kardiovaskulárních příhod, a tedy rizikový prognostický marker. Pokles EPC během sledování při dlouhodobě stabilizované funkci transplantované ledviny nebyl objasněn a vyžaduje další sledování.

■ KOMENTÁŘ

Prof. MUDr. Vladimír Teplan, DrSc.

Ačkoli problematika EPC již není zcela nová a byla publikována řada klinických i experimentálních studií, mechanismy indukce těchto buněk z kostní dřeně i samotný mechanismus reparace poškozených endoteliálních buněk nejsou dosud plně objasněny.

V modelových studiích se předpokládá, že ischemie (více akutní, méně chronická) aktivuje řadu interferujících faktorů (růstové faktory, enzymy, ligandy a povrchové markery), které ovlivňují aktivitu atrakce EPC z kostní dřeně a jejich strukturální modifikaci. Z tohoto hlediska se uvádí především aktivace proangiogenních cytokinů závislých na ischemii, jako jsou SDF-1 (stroma cell-derived faktor-1), VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor), z dalších pak placentární růstový faktor, G-CSF a GM-CSF. Přímou v kostní dřeni se pak významně účastní metaloproteáza-9, pro jejíž aktivaci je zřejmě klíčový účinek NO při aktivitě eNOS.

Mezi významné metabolity, jejichž koncentrace se podílí na ovlivnění endoteliální dysfunkce, patří i asymetrický dimethylarginin (ADMA), endogenní inhibitor NO syntázy. Zvýšená hodnota ADMA je prokazatelným markerem endoteliální dysfunkce u nefrologicky nemocných. Zvýšená hodnota ADMA závisí na renální funkci, ale je ovlivňována i dalšími metabolickými poruchami (např. obezitou). Střední zvýšení ADMA bylo opakovaně popsáno u řady dalších chorob a metabolických odchylek, jako jsou hyperlipidémie, diabetes mellitus, arteriální hypertenze, hyperhomocysteinémie či srdeční selhání. Zvýšená koncentrace ADMA pozitivně koreluje s markery aterosklerózy, jako je např. tloušťka intimy-medie karotické arterie a má i prediktivní hodnotu pro akutní kardiovaskulární komplikace v prospektivních studiích.

Endoteliální progenitorové buňky se mohou významně podílet na integritě endotelu cév. Podle původní představy se mohou diferencovat do podoby endoteliálních buněk, a tím zacelit defekt v endotelu. Nověji se předpokládá, že jsou integrovány

do endoteliálních buněk mechanismem „cell-cell fusion“. Je však možné, že se uplatňují oba mechanismy. EPC jsou mobilizovány a aktivovány z kostní dřeně do periferní cirkulace. Tento proces je regulován řadou růstových faktorů, enzymů, ligandů a receptorů buněčných povrchů, jakož i přímým účinkem zvýšeného průtoku krve kostní dřeně. Intenzivní fyzický trénink vede k účinné aktivaci a stimulaci EPC. Při pravidelné fyzické aktivitě se zvyšuje počet EPC jak u zdravých, tak u nemocných s postižením cév. Toto zvýšení může dosahovat až 280 % během čtyř týdnů pravidelného cvičení. Takovéto zvýšení může být částečně vysvětleno stimulací kostní dřeně v důsledku lokálního zvýšení dostupnosti NO. Současně může cvičení také ovlivnit up-regulaci EPC s jejich sníženým poškozením apoptózou. To je pravděpodobně zprostředkováno inhibicí pro-apoptotického enzymu kaspázy-3. Funkce a počet EPC mohou být také nepřímo ovlivněny koncentrací cirkulujícího reaktivního proteinu (CRP). Protizánětlivý účinek aerobního cvičebního tréninku je spojen s ovlivněním systémových biomarkerů zánětu, především cirkulujících cytokinů a CRP. Jak známo, v patogenezi aterosklerózy se uplatňuje řada cytokinů (IL-1, 4, 6, 8, 10) a makrofágy uvolňovaných cytokinů, jako je TNF α , interferon- γ a CSF (colony stimulating factor). Většina současných studií se shoduje v tom, že intenzivní fyzický trénink snižuje koncentraci prozánětlivých cytokinů (TNF α , IL-1 β , IFN- γ a CRP). Současně stoupá koncentrace protizánětlivých cytokinů, především IL-10 a IL-4. Je tedy zřejmé, že pozitivní účinek dlouhodobého aktivního cvičení může být vysvětlen souhrou více mechanismů zahrnujících zvýšenou aktivitu NO a antioxidační účinek, pokles prozánětlivých cytokinů v tukové tkáni, skeletálních svalech a zvýšení celkové regenerační kapacity endotelu vyjádřené počtem cirkulujících EPC. Ke snížení počtu cirkulujících EPC může vést i zvýšená prozánětlivá adipocytokinová aktivita, jak ukazují studie u výrazně obezity, a jejich opětovné zvýšení po úbytku viscerální tukové tkáně při dietním režimu.

Chronická dysfunkce štěpu je nejčastější příčinou ztráty funkce transplantované ledviny v dlouhodobém období. Je charakterizována neointimální hyperplazií, která může indukovat vaskulární okluzi. Endoteliální progenitorové buňky pocházející z kostní dřeně mohou hrát velmi významnou roli v reparaci poruch endotelu, a tak vést k úpravě tvorby neointimy a průchodnosti intrarenálních arterií. Studie sledující EPC u nemocných po transplantaci ledviny jsou zatím ojedinělé. Většina z nich sleduje buňky CD34 jako jeden z hlavních markerů k identifikaci EPC v periferní krvi. Nejnověji byly identifikovány jejich prekursori – buňky CD133+/VEGFR, jako významný a zřejmě i přesnější marker pro endoteliální reparaci. Podle autorů studie nemusí hodnocení periferní aktivity EPC pomocí samotných CD34 vždy přesně vyjádřit koeficient endoteliální reparace a mělo by být doplněno dalším vyšetřením.

Komentovaná práce sledovala periferní EPC pocházející z kostní dřeně. Šlo o randomizovaný prospektivně dlouhodobě sledovaný soubor nemocných definujících závislost reparační schopnosti endoteliální dysfunkce na úrovni funkce transplantované ledviny. Překvapivě nebyl na rozdíl od jiných studií prokázán vliv věku. Ve studiích bylo u kardiologicky nemocných totiž ukázáno, že

schopnost kostní dřeně reagovat na hypoxii (např. po infarktu myokardu) klesá při vyšším věku. Dále nebyl ani prokázán vliv tělesné hmotnosti v této věkové kategorii, která měla též překvapivě nižší BMI, než bylo zjištěno například v našich studiích. Nebyl ani jasně vysvětlen možný vliv ARB a inhibitorů ACE, kdy může být ovlivněna perfuze kostní dřeně, a tím by se mohl vysvětlit pozitivní účinek léčby. Je však možné, že šlo pouze o efekt lepší renální funkce transplantované ledviny. Účinek ESA je v literatuře popisován jako stimulační, v komentované studii však indikací pro ESA byla nepochybně renální anémie při zhoršené funkci, což také nebylo jasně vysvětleno.

Cílem studie bylo hodnocení standardní imunosupresivní léčby kalcineurinovými inhibitory (CyA a Tac) a jejich srovnání po konverzi z CyA na Tac. Vzhledem k tomu, že neexistují komparativní studie s podáváním imunosuprese zdravým jedincům, lze její možný (a předpokládaný) vliv těžko jednoznačně odhadnout. Na jedné straně mohou ovlivnit koncentraci prozánětlivých cytokinů ve smyslu pozitivním, na straně druhé mohou ovlivnit jak aktivaci EPC z kostní dřeně, tak jejich vlastní reparační schopnosti úpravy buněk endotelu. Ve sledovaném souboru komentované práce tyto rozdíly zjištěny nebyly.

Na základě zjištěných výsledků lze uzavřít, že konverze imunosupresivní léčby z cyklosporinu na tacrolimus nebyla spojena se zlepšeným účinkem na EPC. Byly však prokázány nízké hodnoty EPC v dlouhodobém horizontu sledování, a to přes relativně dobrou stabilní funkci transplantované ledviny při standardně užívaných koncentracích obou léčiv, což nepochybně představuje marker zvýšeného rizika kardiovaskulárních příhod po transplantaci ledviny.

I když jsou výsledky komentované studie zajímavé a aktuální, nelze je přeceňovat. Vedle již zmíněné heterogenity a velikosti souboru byla zřejmá interference řady dalších možných stimulačních i inhibičních faktorů a nelze vyloučit ani rozdíl mezi strukturou stěny nemocných s ischemickou chorobou srdeční a dlouhodobě dialyzovaných po transplantaci ledviny i z hlediska endoteliální dysfunkce.

Je tedy zřejmé, že zjištěné nálezy jsou i nadále pilotní a je třeba rozsáhlejších studií k potvrzení jejich závěrů.

Literatura

- de Groot K, Bahlmann FH, Bahlmann E, et al. Kidney graft function determines endothelial progenitor cell number in renal transplant recipients. *Transplantation* 2005;79:941–945.
- Herbrig K, Gebler K, Oelschlaegel U, et al. Kidney transplantation substantially improves endothelial progenitor cell dysfunction in patients with end-stage renal disease. *Am J Transplant* 2006;6:2922–2928.
- Di Marco GS, Rustemeyer P, Brand M, et al. Circulating endothelial progenitor cells in kidney transplant patients. *PLoS One* 2011;6:1–9.
- Miriuka SG, Rao V, Peterson M, et al. mTOR inhibition induces endothelial cell death. *Am J Transplant* 2006;6:2069–2072.
- Soler MJ, Martínez-Estrada OM, Puig-Marí JM, et al. Circulating endothelial progenitor cells after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2005;5:2154–2159.
- Steiner S, Winkelmayer WC, Kleinert J, et al. Endothelial progenitor cells in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2006;81:599–606.
- Yang L, Yang XC, Yang JK, et al. Cyclosporin A suppresses proliferation of endothelial progenitor cells: involvement of nitric oxide synthase inhibition. *Intern Med* 2008;47:1457–1460.