

**Unverzita Karlova**  
**Lékařská fakulta v Plzni**

**Disertační práce**

**Plzeň 2021**

**Július GELŽINSKÝ**

**Univerzita Karlova**  
**Lékařská fakulta v Plzni**

Studijní program: Vnitřní nemoci

**METABOLICKÉ A GENETICKÉ FAKTORY CÉVNÍHO STÁRNUTÍ**

**METABOLIC AND GENETIC FACTORS OF VASCULAR AGEING**

**Disertační práce**

Školitel: prof. MUDr. Otto Mayer Jr, CSc.

Plzeň, 2021

**MUDr. Július Gelžinský**

## Abstrakt

Tepenný systém je systémem trubic, který vede krev. Jeho stárnutí vede ke dvěma patologiím: ateroskleróze a arterioskleróze - tuhnutí tepenné stěny. Tyto patologie spolu můžou koexistovat a interferovat, liší se však svojí patogenezí, lokalitou, rozsahem a konsekvencemi. Progresivní ztráta elasticity stěny velkých arterií vede k jejich tuhnutí a je přirozenou součástí stárnutí tepenného systému. Tuhnutí centrálních tepen je kromě jiného zodpovědné za řadu věkově podmíněných projevů, jako je vzestup centrálního systolického tlaku, či vznik izolované systolické hypertenze ve stáří. Klinicky se tepenná tuhost centrálních tepen může měřit jako rychlost šíření aortální pulzové vlny. Tu jsme v současnosti schopni kvantifikovat kromě jiného pomocí aplanační tonometrie. Existují bohaté důkazy, že rychlost aortální pulzové vlny představuje nezávislý prediktor kardiovaskulární morbidity a mortality. Nejdůležitějším mechanismem v progresi tepenného tuhnutí je mechanické opotřebování elastinových vláken, které vede k jejich frakturám, fragmentaci a ztenčování. Kromě mechanické komponenty může být rychlost tuhnutí akcelerována řadou dalších mechanismů, jako je například depozice různých substancí v cévní stěně (vápník, produkty pokročilé glykace, atd.), metabolický obrat klíčových extracelulárních komponent (kolagenu a elastinu) či individuální genetické pozadí.

Tato disertační práce se zabývá hledáním potenciální asociace zvýšené tepenné tuhosti v rámci průřezové studie. Dále byly hledány prediktory zvýšené progresi tepenného tuhnutí na základě osmiletého pozorování. Zkoumání bylo zaměřeno na metabolické faktory s důrazem na parametry glukózového metabolismu. Vedlejším předmětem zkoumání byl vliv hladiny vitamínu K a vybraných genetických polymorfismů na progresi tuhosti cévní stěny.

**Klíčová slova:** tepenné tuhnutí, rychlost aortální pulzní vlny, produkty pokročilé glykace, solubilní receptor pro produkty pokročilé glykace, vitamín K, genetické polymorfismy

## **Abstract**

Arterial system is a system of vessels distributing blood. Ageing of arterial system leads to two distinct pathologies: atherosclerosis and arteriosclerosis - stiffening of arterial wall. These pathologies can coexist and interfere; however, they differ in their pathogenesis, location, scope and consequences. Progressive loss of elastic properties of large arteries is natural part of vascular ageing. It is directly responsible for several age dependent consequences, such as increase of central systolic pressure or prevalence of isolated systolic hypertension in the elderly. Clinically, central arteries stiffness manifests as aortic pulse wave velocity, which can be quantified, among other methods, using applanation tonometry. There is abundant evidence that aortic pulse wave velocity represents an independent predictor of cardiovascular mortality and morbidity. The most important mechanism in arterial stiffening is repeated mechanical damage which leads to fractures, fragmentation and thinning of elastin. Stiffening of large arteries can be accelerated by several other mechanisms, e.g. deposition of several substances (calcium, advanced glycation end-products, etc.), metabolic turnover of key elements of vascular extracellular matrix (collagen and elastin) or individual genetic susceptibility.

In this dissertation thesis, the main aim was to evaluate potential associations with increased aortic pulse wave velocity in a cross-sectional design. Moreover, potential predictors of accelerated arterial stiffening were assessed in a prospective study that lasted eight years. The main focus was on metabolic factors with emphasis on glucose metabolism. Secondary aim was to evaluate the effect of vitamin K and selected single nucleotide polymorphisms.

Key words: arterial stiffening, aortic pulse wave velocity, advanced glycation end-products, soluble receptor for advanced glycation end-products, vitamin K, genetic polymorphisms



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně, a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Plzni, 21.06.2021

Július Gelžinský

## Obsah

Abstrakt .....	2
Abstract.....	3
Prohlášení .....	4
Obsah.....	5
Seznam použitých zkratk .....	7
1 Úvod .....	8
1.1 Anatomie a rozdělení tepenného systému .....	8
1.2 Funkce tepenného systému a jejich poruchy .....	10
1.3 Tlakové vlny a tepenná tuhost .....	11
1.4 Měření vlastností tepenného systému .....	12
1.4.1 Měření krevního tlaku .....	12
1.4.2 Analýza pulzové vlny.....	13
1.4.3 Rychlost šíření pulzové vlny.....	14
1.4.4 Další metody měření vlastností tepenného systému .....	16
1.5 Patofyziologie stárnutí tepenného systému.....	18
1.6. Důsledky stárnutí tepenného systému.....	19
1.7 Faktory ovlivňující progresi cévní tuhosti .....	23
1.7.1 Vliv arteriální hypertenze.....	23
1.7.2 Faktory životního stylu .....	24
1.7.3 Vliv kalcifikace .....	25
1.7.4 Vliv parametrů glukózového metabolismu .....	26
1.7.5 Genetické faktory .....	27
1.7.6 Farmakoterapie.....	28
2 Hypotézy a cíle práce .....	30
3 Materiál a metodika .....	31
3.1 Design studie a studovaná populace .....	31
3.2 Vyšetření a laboratorní metody.....	32
3.3 Měření tuhosti centrálních tepen.....	34
3.4 Statistická analýza.....	35
3.5 Etické aspekty .....	35
4 Výsledky.....	36
4.1 Asociace mezi parametry glukózového metabolismu a cévní tuhostí - výsledky průřezové studie.....	36
4.2. Souhrn základních výsledků prospektivní studie.....	37

4.3	Solubilní receptor pro produkty pokročilé glykace jako nezávislý prediktor vzestupu rychlosti aortální pulzní vlny .....	38
4.4	Parametry AGE-RAGE osy jako prediktory tuhnutí cévní stěny .....	40
4.5	Vliv hladiny vitamínu K na cévní stárnutí.....	41
4.6	Další realizované sub-analýzy .....	42
4.6.1	Progrese cévní tuhosti podle konvenčních rizikových faktorů .....	42
4.6.2	Vztah mezi sclerostinem a věkově podmíněným tuhnutím cévní stěny .....	43
4.6.3	Analýza vybraných genetických polymorfismů a jejich vztah k cévnímu tuhnutí.....	44
5	Souhrnná diskuze .....	45
5.1	Klinický význam měření tepenné tuhosti .....	46
5.2	Současnost a budoucnost studování tepenné tuhosti .....	47
5.3	Osa AGE-RAGE v kontextu tepenné tuhosti .....	49
5.4	Limitace .....	49
6	Závěry.....	50
7	Seznam použité literatury .....	51
8	Přílohy .....	58
	Poděkování .....	95

## Seznam použitých zkratek

ACEi	Inhibitor angiotensin konvertujícího enzymu
AGEs	Advanced glycation end products - produkty pokročilé glykace
aPWV	Rychlost aortální pulzní vlny
AU	Arbitrární jednotka
BB	Betablokátor
BKK	Blokátor kalciového kanálu
BMI	Body mass index - index tělesné hmotnosti
CI	Konfidenční interval
CML	Karboxymethyl lyzin (představitel cirkulujících AGEs)
CVD	Kardiovaskulární onemocnění
DM	Diabetes mellitus
dp-ucMGP	nefosforylovaný a nekarboxilovaný Matrix Gla-protein
eGFR	Glomerulární filtrace
EVA	Early Vascular Ageing - časné tepenné stárnutí
FMD	Flow mediated dilation- ischemií indukovaná dilatace
GWAS	Genome-wide association study
HbA1c	Glykovaný hemoglobin
HWE	Hardyho-Weinbergovo equilibrium
ICHDK	Ischemická choroba dolních končetin
ICHS	Ischemická choroba srdeční
IMT	Šířka komplexu intimy a média
KV	Kardiovaskulární
MAP	Střední arteriální tlak
MGP	Matrix Gla protein
OR	Odds ratio - poměr šancí
PC-MRI	Phase-contrast MRI
PP	Pulzní tlak
PWA	Analýza pulzové vlny
PWV	Rychlost šíření pulzní vlny
RAGE	Receptor pro AGEs
SE	Standard error
SEM	Standard error of means
SNP	Single nucleotide polymorfismy - jedno nukleotidové polymorfismy
sRAGE	Solubilní receptor pro AGEs
SUPERNOVA	Supernormal vascular age - zpomalené stárnutí tepen
TF	Tepová frekvence
TK	Krevní tlak

# 1 Úvod

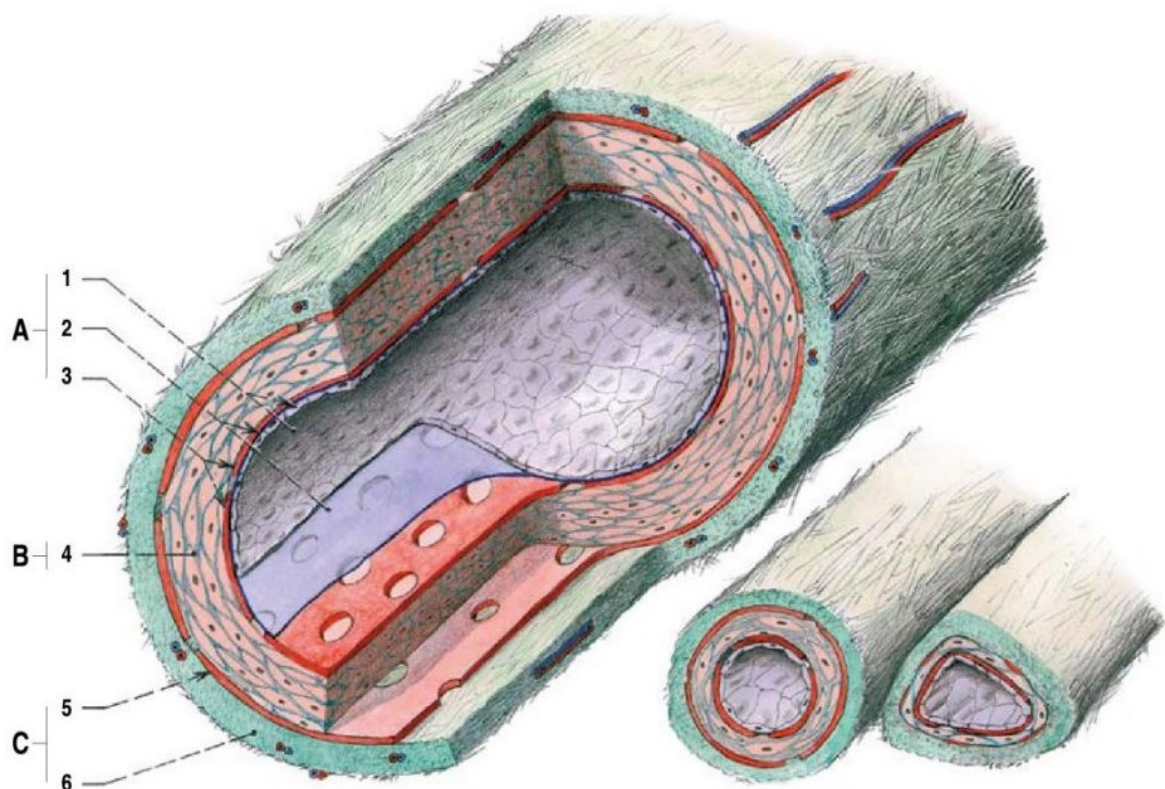
Cévní systém je systémem trubic, který vede krev. Tím zprostředkovává látkovou výměnu ve tkáních, výměnu krevních plynů, vylučování zplodin metabolismu a plní řadu dalších významných funkcí. Tvoří ho tepny, které vedou krev ze srdce, kapiláry, představující konečné sítě cév, a žíly vedoucí krev z kapilár do srdce (Čihák et al. 2001).

V rámci této disertační práce bylo zkoumání zaměřeno na otázku stárnutí tepen, které je charakterizováno věkově podmíněnou progresivní ztrátou elasticity a tuhnutím primárně centrálních tepen. Následující část bude proto zaměřená na tepenný systém. Problematika zbylých, ale neméně důležitých částí kardiovaskulárního systému - srdce, kapilár a žil - bude v textu popisována okrajově při nutnosti pro pochopení základní problematiky.

## 1.1 Anatomie a rozdělení tepenného systému

Tepenný systém je systémem cévních trubic vedoucích krev ze srdce do tkání. Začíná hned za aortální chlopní jako ascendentní aorta, postupně se větví na stále tenčí tepny a končí tenkostěnnými tepénkami, neboli arterioly, za nimiž začíná systém kapilár. Tepny jsou adaptované na pulzové nárazy krve vypuzované ze srdce a vysoký krevní tlak, mají tedy pevné a pružné stěny. Každá tepna je tvořena třemi vrstvami: tunica intima, tunica média a tunica externa.

Tunica intima je složena z jedné vrstvy plochých endotelových buněk. Tyto buňky jsou podloženy sítí elastických a kolagenních vláken, které se souhrnně označují jako membrana elastica interna. Pod intimou se nachází tunica média, která je obecně nejsilnější částí tepenné stěny. Je složena ze spirálovitě nebo cirkulárně uložených koncentrických vrstev buněk hladké svaloviny a sítí kolagenních a elastických vláken, případně elastických blanek. V tepnách většího kalibru nalézáme tenčí lamínu elasticu externu, která je svým složením podobná lamíně elastica interna a odděluje médii od poslední vrstvy - tunica externa, zvané též adventitia. Ta je tvořena kolagenními a elastickými vlákny, které přecházejí do vaziva v okolí cévy a tím ji k němu fixují. Procházejí jí vasa vasorum, lymfatické cévy a nervy, které mohou pronikat až do zevní vrstvy média. Schéma obecné stavby tepny lze vidět na obrázku 1.



Obr. 57. SCHEMA OBECNÉ STAVBY CÉVNÍ STĚNY u arterie střední velikosti, svalového typu; znázorněny vrstvy cévní stěny; vpravo ukázány proporce jednotlivých vrstev stěny u tepny (silnější stěna) a u přibližně stejně silné žily (tenčí stěna)

- |  |   |
|--|---|
| A tunica intima  | B tunica media                          |
| 1 endothel   | 4 buňky hladké svaloviny v tunica media |
| 2 lamina basalis endotheli a subendothelová vrstvička vaziva | C tunica externa                        |
| 3 membrana elastica interna                                  | 5 membrana elastica externa             |
|  | 6 vazivo adventicie, v něm vasa vasorum |

### Obrázek 1 – Schéma obecné stavby cévní stěny; Převzato z Čihák 2001

Svalová média arteriál má jednu až pět vrstev hladkých svalových buněk, směrem k srdci počet těchto vrstev narůstá a může dosahovat až 40 vrstev hladkých svalových elementů. Jejich množství se však následně snižuje s velikostí průsvitu cévy, kdy začne převažovat obsah vaziva. Na základě velikosti tepny tedy převažuje v tunica média vazivová nebo svalová složka a podle toho lze tepny rozdělit na tepny elastického a svalového, neboli muskulárního typu. Je nutno doplnit, že tepenný systém je značně přizpůsoben fyziologickým nárokům a podmínkám, proto mají například nízkotlaké plicní arterie tenčí stěnu než tepny systémové, které jsou vystaveny mnohem vyššímu tlaku. Krevní cévy vytvářejí spojitý systém a mezi jednotlivými typy existuje řada plynulých přechodů, pro rozlišení mezi velkými tepnami, středními tepnami a arteriálami proto neexistují žádná absolutní kritéria. (Junqueira et al. 1997). Dle výše uvedeného lze tedy tepenné řečiště funkčně rozdělit na centrální tepny elastického typu (aorta a její větve), periferní tepny muskulárního typu, tepny drobného kalibru a rezistenční řečiště tvořené arteriálami.

## 1.2 Funkce tepenného systému a jejich poruchy

Základní funkcí tepen je vést krev ze srdce do periferních orgánů, tzv. conduit function. Tuto funkci plní všechny tepny a je závislá na jejich průsvitu. Porucha funkce vedení nastává při zúžení průsvitu nebo ucpání tepny. Nejčastější příčinou poruchy vedení je ateroskleróza, která je nemocí primárně intimy, a jejím následkem je ischemie nebo infarkt tkáně zásobované příslušnou tepnou. Z uvedeného vyplývá, že porucha funkce vedení se projeví periferně od postižené cévy. Dobré vedení odráží střední tlak krve, který za normálních okolností neklesá a v průběhu celého tepenného systému až po začátek rezistenčního řečiště se udržuje na stabilní hodnotě.

Druhou funkcí tepen je nárazníková, neboli buffering function. Jedná se o tlumení tlakových oscilací vznikajících při kontrakci levé srdeční komory a přeměnu přerušovaného krevního proudu v plynulý. Tuto funkci plní primárně centrální tepny elastického typu. Při systole dochází k prudkému nárůstu tlaku v tepenném řečišti, elastické tepny se jeho vlivem roztáhnou a tím zadrží asi 60% krve. Během diastoly se při poklesu krevního tlaku zase postupně stahují a zadrženou krev vypuzují. Dobrou nárazníkovou funkci odráží nízký centrální pulzní tlak krve, který je rozdílem systolického a diastolického tlaku, a který se směrem k periférii amplifikuje. Porucha této funkce nastává při zvýšené rigiditě (a tudíž snížené elasticitě) cévní stěny, která vzniká na podkladě změn v tepenné médii. Důsledkem poruchy nárazníkové funkce dochází k navýšení systolického krevního tlaku v centrálním řečišti a tím se navyšuje afterload levé srdeční komory. Současně dochází ke zvýšení pulzního tlaku. Tyto zvýšené oscilace se přenášejí hlouběji do periferního řečiště až do mikrocirkulace a poškozují primárně orgány s vysokým průtokem krve - mozek a ledviny. Porucha nárazníkové funkce se tedy projevuje jak proximálně, tak distálně od postižené cévy.

Třetí funkcí tepen je regulace krevního průtoku cílovou tkání. Tuto funkci plní tepny svalového typu a arterioly. Jedná se o cílenou regulaci a přesměrování krevního průtoku pomocí vazokonstrikce či vazodilatace a podílí se na ní jak endotel produkcí vazodilatačních a vazokonstrikčních působků, tak svalové buňky média změnou svého tonu, přičemž jejich stimulace může přicházet jak parakrinně z intimy, tak z autonomních nervových vláken přicházejících z adventitie. Tímto způsobem je za normálních okolností regulováno stabilní krevní zásobení vysokoprůtokovými orgány, jako jsou mozek a ledviny, dále však i například krevní zásobení svalové tkáně, které je úměrné její

metabolické aktivitě a výrazně odlišné při práci a odpočinku. Regulační funkce je komplexní jev a jeho hlubší rozbor je vysoce nad rámec této disertační práce.

Tepenný systém je jako celek velice složitý a jeho jednotlivé funkce spolu vzájemně souvisí, ovlivňují se a interagují, přičemž porucha jedné může vést k ovlivnění druhé. Například při poruše nárazníkové funkce způsobené tuhnutím centrálních tepen dochází k přenášení pulzatility do periferních tepen, které na to reagují remodelací a zvýšením své rezistence, což následně vede k zvýšení centrálního tlaku, které dále akceleruje tuhnutí centrálních tepen (Laurent and Agabiti-Rosei 2015). Je třeba pamatovat, že pozorované jevy vycházejí z komplexní interakce různých mechanismů. Vysvětlení těchto jevů se tudíž nedá uzavřít použitím pouze jednoho z nich.

### 1.3 Tlakové vlny a tepenná tuhost

Kontrakcí levé komory srdeční vznikají oscilace tlaku, proudu a průměru tepen šířící se po celém tepenném řečišti. Nejdostupnější a nejméně náročné na provedení je měření fluktuací tlaku. Základní manifestací těchto tlakových fluktuací je pulz hmatný na velkých dostupných arteriích (Asmar et al. 1999). Pulzová vlna vznikající při systole se šíří tepenným řečištěm směrem k periférii, kde se na místech s rozdílnou impedancí (odporem) odrazí a postupuje zpátky k srdci. Místa těchto odrazů jsou všude, kde se tepenné řečiště větví nebo zužuje, přičemž se za hlavní místa odrazu pokládá větvení drobných tepen na arterioly. Primární a odražené vlny spolu interferují, přičemž se udává, že na obrazu definitivní tlakové vlny se podílí až zhruba vlna 20. řádu (Filipovský 2019). Odraz tlakových vln je komplexní a závisí na řadě faktorů, jako jsou amplituda primární tlakové vlny, rigidita velkých tepen, vzdálenost míst odrazu, průměr tepen či strukturální stav periferního oběhu.

Rychlost šíření pulzové vlny (PWV) byla na základě studia modelů vyjádřena Moens-Kortewegovou rovnicí (Asmar et al. 1999):

$$PWV^2 = \frac{E \cdot H}{2r \cdot \rho}$$

E vyjadřuje tuhost tepny, H je celková tloušťka cévy, r je její vnitřní poloměr a  $\rho$  hustota krve. Z dané rovnice vyplývá, že rychlost šíření pulzové vlny je přímo úměrná rigiditě neboli tuhosti tepenné stěny. Čím je tuhost větší, tím rychleji se pulzové vlny šíří a jejich rychlost dosahuje až 5-20 ms<sup>-1</sup>. Strukturální tuhost je dána jak vlastnostmi



materiálu, ze kterého je cévní stěna složena, tak její geometrií - průměrem a šířkou. Materiální tuhost je vyjádřena vztahem mezi působící vnější silou a deformací, kterou tato síla způsobí. V případě tepen je vnější síla charakterizována krevním tlakem a deformace jejich roztažením při daném tlaku. Stěny arterií jsou, jak bylo popsáno výše, komplexní a každá jejich složka se podílí na výsledné tuhosti dané tepny. Při nízkém tlaku se do materiální tuhosti zapojují primárně elastická vlákna, se zvyšujícím se tlakem je síla přenášena i na pevnější a tužší kolagenová vlákna. Tepenná tuhost, a analogicky PWV, tedy není lineární a musí být interpretována jako funkce krevního tlaku. (Boutouyrie et al. 2021)

## **1.4 Měření vlastností tepenného systému**

Tepenný systém je velice komplexní a existuje velký počet metod měřících jeho vlastnosti. Tyto metody se vzájemně odlišují svojí invazivitou, reprodukovatelností, časovou náročností a tím, jestli popisují jeho strukturu nebo funkci. Žádná metoda tedy samostatně nevystihuje celkový funkční stav nebo strukturu tepenného systému.

### **1.4.1 Měření krevního tlaku**

Tlak krve (TK) se dá měřit přímými a nepřímými metodami. Přímé metody jsou invazivní a je při nich do tepny zavedena kanyla s barosenzorem. Metody využívající různé neinvazivní techniky, jako například auskultační, oscilační či Peňázovu, se souborně označují jako nepřímé metody.

V současnosti nejvíce rozšířenou a nejjednodušší metodou měřící vlastnosti tepenného systému je měření periferního krevního tlaku, kde se na pažní tepně registruje systolický a diastolický TK. Z funkčního hlediska má největší smysl vyhodnocovat střední arteriální tlak (MAP) a pulzní tlak (PP). MAP je průměrný tlak v tepenném řečišti a z hemodynamického hlediska je součinem srdečního výdeje a celkové periferní rezistence. Na periferní rezistenci se nejvíce podílí arterioly a tudíž se nejvíce podílejí i na výši MAP, který je za fyziologických okolností udržován na konstantní úrovni ve velkých i menších tepnách. Pulzní tlak je rozdílem systolického a diastolického TK a vyjadřuje pružnickovou funkci centrálních tepen. Z hemodynamického hlediska je určen kontraktilitou srdce, tepovým objemem, elastickými vlastnostmi tepen a odrazem pulzních

vln. S postupem tlakové vlny se PP na rozdíl od MAP mění. Jeho amplituda se směrem do periferie zvyšuje, čemuž se říká amplifikace krevního tlaku. (Herbert et al. 2014)

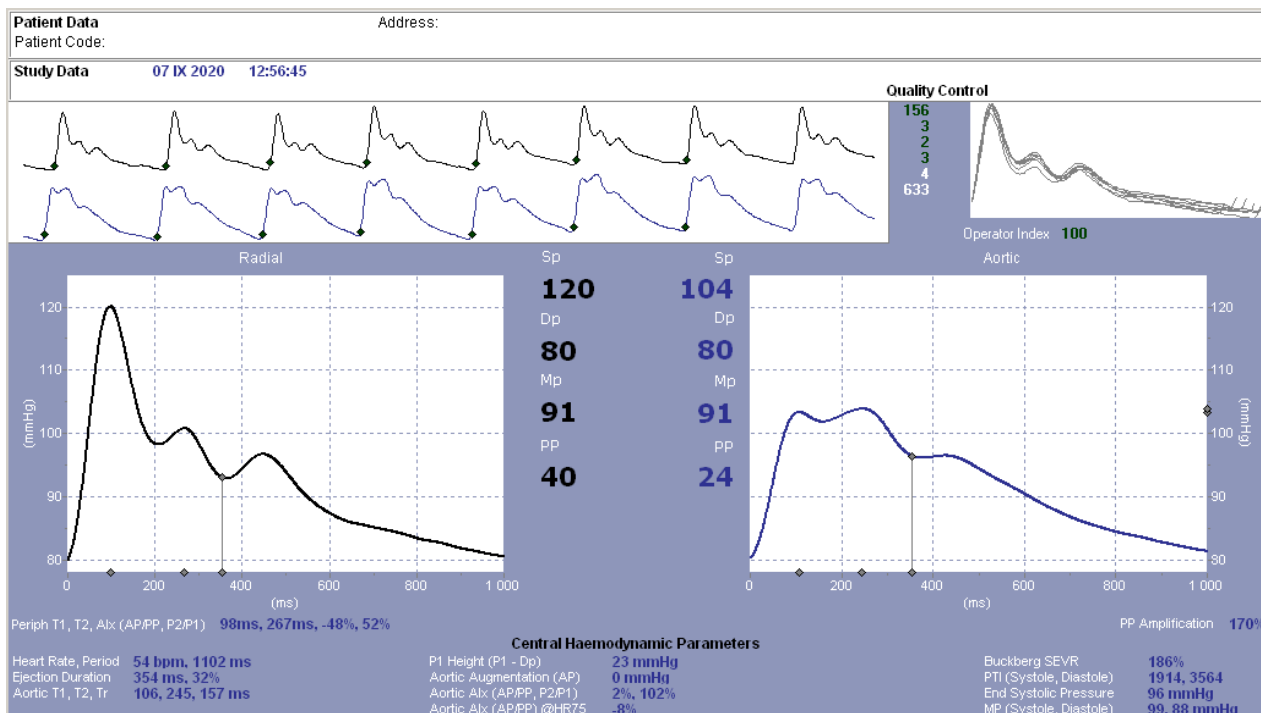
### 1.4.2 Analýza pulzové vlny

Na rozdíl od diastolického TK a MAP, které se udržují v průběhu tepenného řečiště relativně konstantní, je z důvodu amplifikace krevního tlaku systolický tlak na brachiální arterii a v centrálním řečišti odlišný. Z hlediska predikce kardiovaskulárních příhod je stanovení TK v centrálních tepnách významnější než stanovení tlaku periferního, i když výsledky studií nejsou zcela konzistentní (Mitchell et al. 2010). Jak ukázaly výsledky studie CAFE, i farmakologické ovlivnění centrálního a periferního systolického TK se může lišit (Williams et al. 2006). Centrální systolický tlak lze měřit invazivními katetrizačními metodami nebo estimací použitím analýzy pulzové vlny.

Analýza pulzové vlny, pulse wave analysis (PWA), je metoda, při které se registruje přesný tvar tlakových vln. Měření může probíhat invazivně přímo v dané tepně nebo neinvazivně. Neinvazivní měření je kalibrováno na periferně změřený krevní tlak, což umožňuje výpočet centrálních tlaků. Registrace pulzových vln pak může probíhat na krkavici, nebo na radiální či brachiální tepně. Tvar vlny měřené na karotidě je téměř identický s vlnou v aortě. Při registraci vlny na periférii se používá validovaná matematická transformace k získání tvaru vlny v aortě (Chen et al. 1997).

Dalším parametrem měřeným pomocí PWA je index odrazu, tzv. augmentation index. Dá se vypočítat jako poměr augmentačního tlaku a pulzního tlaku a vyjadřuje míru, jakou se odražená vlna podílí na vzestupu krevního tlaku. Meta-analýza 11 longitudinálních studií prokázala významnou prediktivní hodnotu augmentačního indexu na kardiovaskulární příhody, a to bez ohledu na naměřený periferní PP (Vlachopoulos et al. 2010). Výsledek měření PWA na radiální tepně pomocí přístroje Sphygmocor<sup>®</sup> je zobrazený na obrázku 2.

Technicky nejnáročnější k provedení jsou separační analýza pulzních vln (WSA) a analýza intenzity vln (WIA). U obou metod se používá kombinace simultánně měřených pulzních a průtokových vln využitím aplanační tonometrie a dopplerovské sonografie. Výsledkem měření je samostatná kvantifikace primární a odražené pulzní vlny a index odrazu (Parragh et al. 2015). V současnosti se jedná o experimentální a výzkumné metody.



**Obrázek 2** – Výsledek analýzy pulzové vlny získaný přístrojem Sphygmocor®. Vlevo je zobrazená pulzní vlna registrovaná na radiální tepně. Vpravo je vlna v aortě získaná matematickou transformací. Uprostřed jsou hodnoty jak brachiálního, tak centrálního TK. Výsledný index odrazu (AIx) je dole v prostředním sloupci. Vlastní měření.

### 1.4.3 Rychlost šíření pulzové vlny

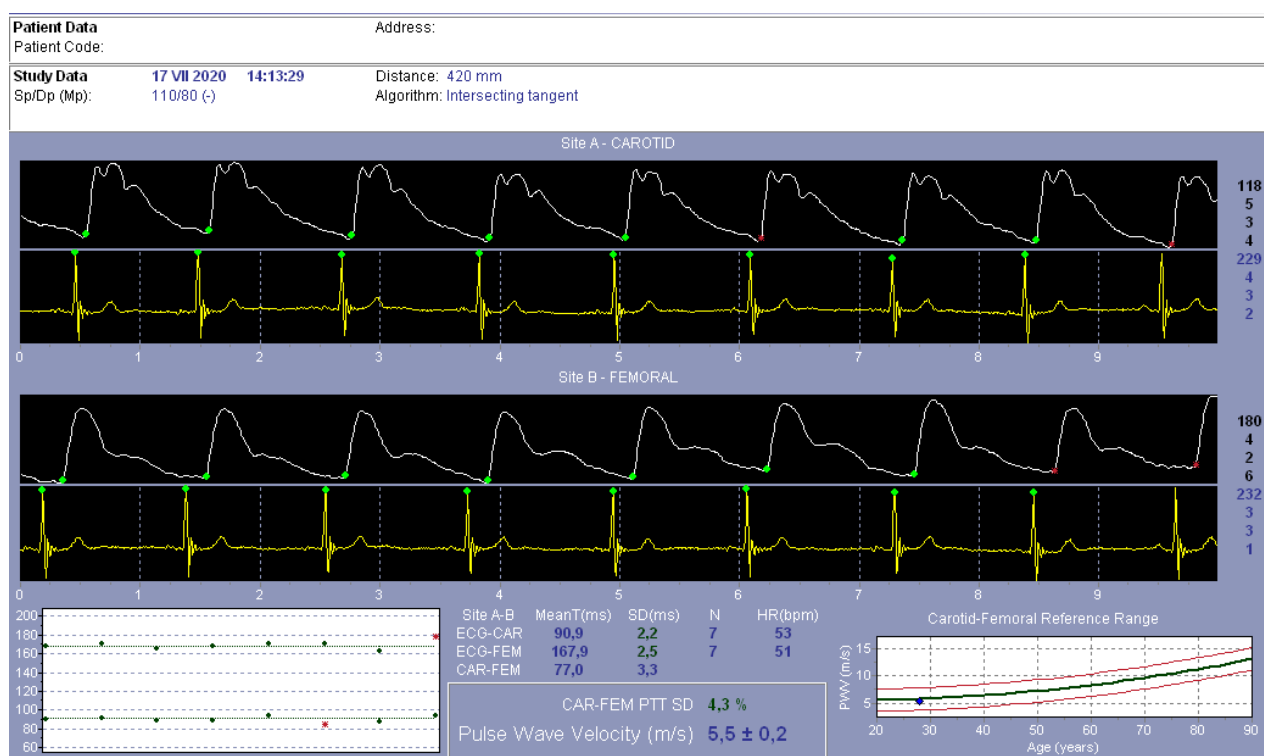
Jak bylo popsáno v stati 1.3, rychlost šíření pulzní vlny je přímo úměrná tuhosti tepenné stěny. Její hodnota tedy vyjadřuje míru rigidity příslušného úseku tepenného řečiště. Vzhledem k tomu, že distálně od srdce se rigidita tepen zvyšuje, zvyšuje se i PWV v daném úseku. Existuje velké množství různých metod určených k měření PWV, které se odlišují svojí invazivitou, náročností na provedení, použitou metodikou nebo zkoumaným úsekem tepenného systému. Nejjednodušší metodou k určení PWV je její výpočet pomocí poměru uražené vzdálenosti a času. (Laurent et al. 2006)

Sfygmometrická metoda měření je neinvazivní, dobře reprodukovatelná, technicky poměrně nenáročná a tudíž vhodná pro použití v populačních studiích a klinické praxi. Je při ní změřena vzdálenost dvou míst na povrchu těla a zjištěn časový posun tepových vln mezi těmito dvěma místy. Z patofyziologického hlediska má největší význam měření PWV v aortě, tzv. aortic pulse wave velocity (aPWV), která charakterizuje nárazníkovou funkci centrálních tepen a je jedním z nejvýznamnějších nezávislých prediktorů KV morbidity a mortality. Jelikož registrace vln nejčastěji probíhá mezi krkavici a femorální tepnou,

v literatuře se taky používá výraz carotid-femoral pulse wave velocity (cf-PWV). Pro velké množství dostupných přístrojů k měření aPWV a různých metodik měření vzdálenosti či určení začátku pulzní vlny byl způsob měření standardizován. K určení začátku pulzní vlny je použita metoda protínajících se tečen, tzv. „intersecting tangents algorithm“. Ke stanovení vzdálenosti se používá přímo měřená vzdálenost mezi tepem na arterii carotis a arterii femoralis násobená koeficientem 0,8. (Collaboration 2010; Van Bortel et al. 2012)

Za absolutní hranici normálu se považuje hodnota PWV 10 m/s. Jelikož je však tepenná tuhost vysoce závislá na věku a aktuálním krevním tlaku, byly v roce 2010 na základě multicentrické evropské studie publikovány referenční hodnoty aPWV v jednotlivých skupinách podle věkových dekád a kategorií TK (Collaboration 2010).

Pro účely této disertační práce byl ke stanovení aPWV použit přístroj Sphygmocor<sup>®</sup>. Ten k registraci pulzních vln používá metodu aplanační tonometrie. K určení časového posunu mezi místy měření je použita současně registrována EKG křivka. Ukázkou výsledku měření lze vidět na obrázku 3.



**Obrázek 3** – Výsledek měření aPWV získaný přístrojem Sphygmocor<sup>®</sup>

Měření probíhá za současné registrace EKG. V horní části je registrace pulzových vln na arterii carotis, v dolní části na a. femoralis. Výsledná rychlost aortální pulzové vlny je dole uprostřed. Vlastní měření.

#### 1.4.4 Další metody měření vlastností tepenného systému

Kromě výše popsaných metod existuje celá řada dalších postupů měřících vlastnosti tepenného systému. Sfygmotetrická metoda umožňuje měření regionální PWV a tím dává informaci o souhrnné tuhosti tepen mezi dvěma body měření.

Regionální měření PWV umožňují i další metody, které jsou však dražší, invazivní, náročnější na provedení nebo kombinací zmíněného. Invazivní měření regionální PWV se provádí pomocí zavedeného katetru, například během kardiální katetrizace, a může sloužit například k validaci jiných metod měření PWV (Weber et al. 2015). Pro riziko spojené s invazivitou, cenu a technickou náročnost zůstává experimentální metodou vyhrazenou pro vysoce specializované pracoviště. Dalším experimentálním, ale neinvazivním přístupem k určení regionální PWV je použití ultrazvukového zařízení s vysokým rozlišením měřícím průtok v tepně. Měření nejčastěji probíhá mezi odstupem levé podklíčkové tepny a bifurkací břišní aorty a v porovnání s aPWV měřenou mezi krkavicí a femorální tepnou více vystihuje tuhost aorty, jelikož v měřeném regionu nejsou zahrnuty méně elastické distální tepny. Výhoda tohoto přístupu však dosud v porovnání s karotido-femorálním měřením prokázána nebyla a tudíž není pro svoji komplikovanost tak rozšířená. Další metodou k určení regionální tuhosti je použití magnetické rezonance. Takzvaná phase-contrast MRI (PC-MRI) umožňuje zachycení průtoku krve v cévním řečišti. Pomocí PC-MRI lze tedy například zachytit časový rozdíl mezi počátkem proudění krve v ascendentní a descendentní aortě a s jeho pomocí vypočítat PWV. Primárně v Japonsku k určení regionální tuhosti používají tzv. Cardio-ankle vascular index (CAVI), který využívá simultánní oscilometrické měření TK na všech končetinách za současného fonografického snímání srdce. Tato metoda se pro svoji komplexnost, nedostatek referenčních dat a zahrnutí muskulárních tepen příliš nerozšířila. (Townsend et al. 2015)

Lokálním parametrem tuhosti jsou poddajnost a roztažnost. Lze je měřit použitím zobrazovacích metod umožňující zobrazení tepny v transverzální rovině. Nejčastěji se používá ultrazvukové vyšetření, tzv. echo-trakcing, k měření na povrchově dostupných tepnách. Experimentálně lze k měření hluboce uložených tepen využít zobrazení pomocí MRI. Tyto metody jsou časově, technicky a finančně náročné, proto jsou používané primárně při studiu patofyziologie, vlivu farmak na tepenné vlastnosti či při mechanistických analýzách. Během vyšetření je měřen průměr tepny při systole a diastole za současné kalibrace na pulzní tlak. Výsledkem poměru absolutní i relativní změny

průměru při měřených změnách tlaku je poddajnost a roztažnost tepny. Při následném použití tloušťky měřené tepny ve výpočtu lze odhadnout i Youngův elastický modul dané tepny, který vypovídá o elastických vlastnostech měřené cévy. (Laurent et al. 2006)

Ke zjištění strukturálních změn elastických tepen je nejpoužívanější metodou měření tloušťky komplexu intimy a média na krkavici, tzv. intima-media thickness (IMT). Využívá duplexní sonografii a kromě měření samotné tloušťky tepny umožňuje nález aterosklerotických plátů či popis jejich charakteru. Hypertrofie stěny a rozšíření intimo-mediální vrstvy předchází rozvoji aterosklerózy. Protože výsledek je závislý na místě měření, obvykle se používá průměr měření v místě bifurkace a několika měření na společné karotidě tak, aby nebyl do výsledku zahrnut aterosklerotický plát (Filipovský 2019). Klinický význam měření IMT s výjimkou sledování aterosklerotických změn však zůstává sporný. Prospektivní studie ELSA zkoumající efekt lacidipinu na progresi aterosklerotických plátů ukázala, že vstupní hodnota IMT byla významným prediktorem KV rizika (Zanchetti et al. 2002). Meta-analýza 41 publikací zahrnující 18307 jedinců však neprokázala efekt farmakologické regrese nebo zpomalení progresu IMT na kardiovaskulární mortalitu (Costanzo et al. 2010).

Endoteliální dysfunkce značí nerovnováhu mezi vazodilatčními a vazokonstrikčními působky produkovanými endotelem. Typickým fyziologickým podnětem k vazodilataci závislé na endotelu je proběhlá ischemie. K testování endoteliální funkce se využívá tzv. flow-mediated dilation (FMD). Brachiální tepna je nejdříve zaškrcena manžetou tonometru, následně je po jejím povolení ultrasonograficky sledována míra dilatace tepny. Takto zjištěná porucha koreluje i s endoteliální dysfunkcí koronárního řečiště. Novější metoda sleduje změny prstového TK po ukončení ischemie vyvolané pažní manžetou tonometru, kde normální reakcí je zvýšení tlakové amplitudy. (Filipovský 2019)

Stav rezistenčního řečiště je studován pomocí invazivní biopsie gluteálního tuku. Po histologickém zpracování je ve tkáních sledován poměr média a lumen. Jedná se o parametr, který charakterizuje stupeň zbytnění hladké svaloviny arteriol. Jelikož se jedná o invazivní metodu, je vhodná především pro výzkumné účely. V současné době je studován přínos neinvazivních metod jako jsou kvantifikace kapilár očního pozadí, či laser doppler flowmetrie, ke kterým zatím chybí data o jejich přínosnosti. (Filipovský 2019)

## 1.5 Patofyziologie stárnutí tepenného systému

Tepenný systém je v průběhu života vystaven mnohým mechanickým a humorálním stimulům, které vedou k jeho přestavbě - remodelaci. Mechanické podněty vycházejí z interakce mezi proudící krví a cévní stěnou a jsou dvojího druhu. Tenzní stres je způsoben tlakovou vlnou a působí kolmo na cévní stěnu. Jak lze odvodit z Laplaceova zákona, tenzní stres narůstá s narůstajícím krevním tlakem a poloměrem cévy a klesá s tloušťkou její stěny. Na tenzní stres reaguje primárně tepenná médie, a to hypertrofií či změnou své struktury, což se projeví zvýšením její tuhosti. Druhým mechanickým podnětem je střižní stres, který působí podél cévní stěny. Je dán frikcí mezi proudící krví a vnitřní stěnou cévy, primárně tedy působí především na endotel. Narůstá s narůstající rychlostí proudění krve a její viskozitou, klesá s narůstajícím poloměrem cévy. Endotel na střižní stres reaguje produkcí vazodilatačních látek (Filipovský 2019). Humorálních podnětů působících na tepny a ovlivňujících jejich stárnutí je nespočetné množství a můžou mít pozitivní, neutrální i negativní vliv. Jejich efekt tedy nelze rámcově zjednodušit.

Stárnutí tepen vede ke dvěma rozdílným patologiím- ateroskleróze a arterioskleróze. Tyto patologie se liší svou patogenezí, lokalitou, rozsahem a konsekvencemi.

Na vzniku aterosklerózy se mimo jiné podílí střižní stres a humorální podněty. Je tedy procesem vznikajícím a rozvíjejícím se primárně v intimě. Je vysoce komplexní a charakterizuje ji vznik lokalizovaných ateromových plátů ve velkých a středně velkých tepnách svalového typu. Důsledkem aterosklerózy je porucha funkce vedení, jak byla popsána výše.

Arterioskleróza vzniká primárně jako odpověď na tenzní stres a tudíž je procesem postihujícím cévní médii. Dochází k difuzní remodelaci tepenné stěny, následkem které je změna jejího strukturálního složení a současně její hypertrofie. Důsledkem remodelace je snížení poddajnosti a tudíž zvýšení tuhosti cévní stěny. Arterioly reagují na zvýšený tenzní stres hypertrofií médie na úkor lumen cévy. Středně velké tepny mají díky své bohaté muskulatuře schopnost reagovat na tenzní stres zvýšením tonu svalových buněk (Laurent and Boutouyrie 2015). Centrální tepny mají médii tvořenou z velké části vazivem, mezi kterým jsou monovrstvy svalových buněk. Vazivo těchto tepen je tvořeno převážně elastinem a kolagenem - s převahou elastinu. Elastogeneze, syntéza elastinu, probíhá za fyziologických podmínek během fetálního a neonatálního období. Tato vlákna jsou

zesíťovaná příčnými můstky, takzvanými cross-linky, a díky tomu mají životnost čítající několik dekád (Arribas et al. 2006). Tužší kolagenní vlákna naopak za normálních okolností cross-linky nemají a podléhají kontinuální recyklaci- degradaci a syntéze. Opakovaným působením tenzního stresu či humorálních podnětů dochází na jedné straně k frakturám, fragmentacím, ztenčování a degradaci elastických vláken, na druhé straně ke zvýšené depozici nebo zesíťování kolagenních vláken. V centrálních tepnách tedy arterioskleróza vede jak ke změně složení jejich stěny- remodelaci, tak k jejich ztluštění- hypertrofii (Boutouyrie et al. 2021). Oba tyto procesy vedou k zvyšování tuhosti centrálních tepen, následkem čehož dochází k poruše nárazníkové funkce.

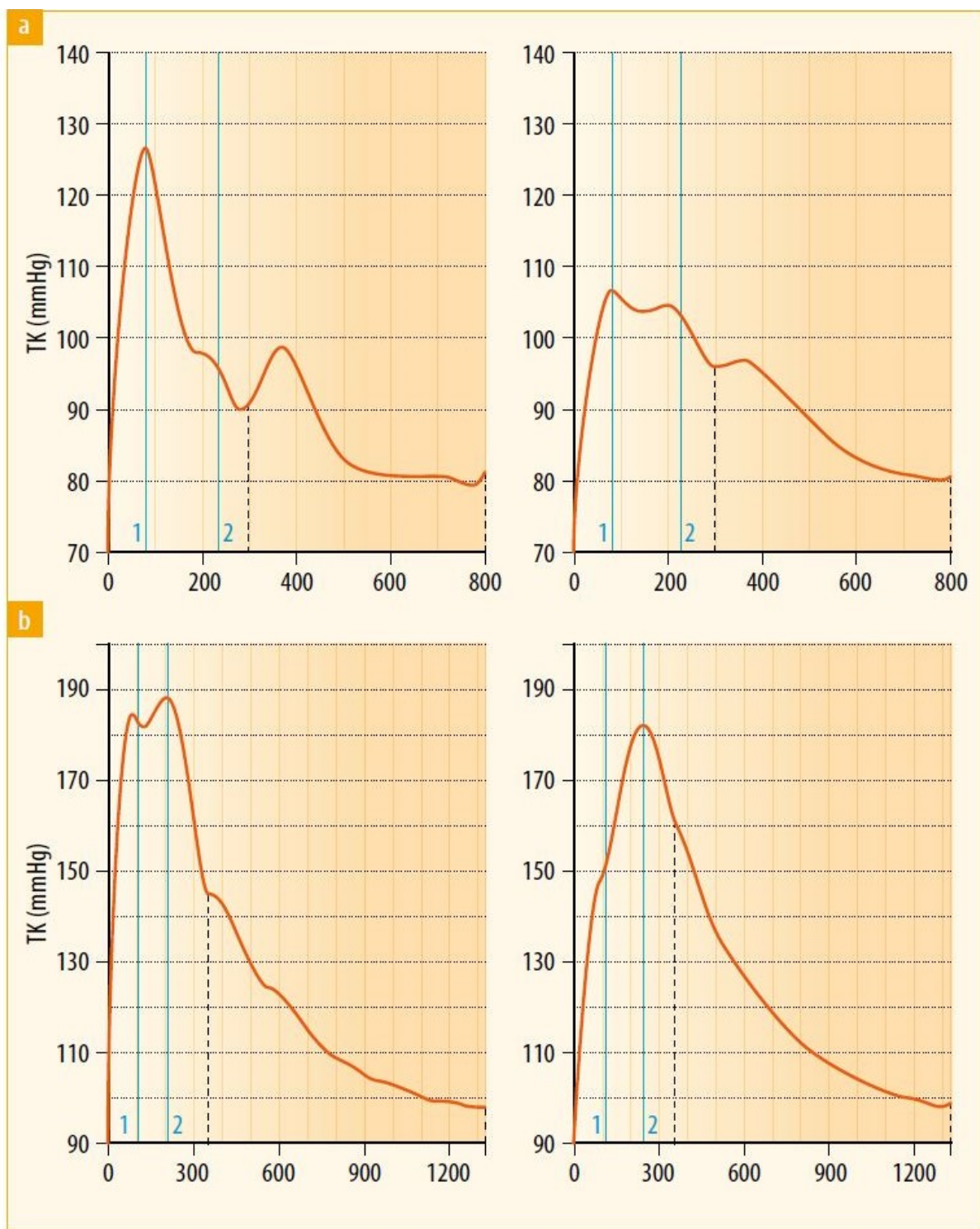
## **1.6. Důsledky stárnutí tepenného systému**

Důsledkem aterosklerózy je ischemie tkáně zásobované postiženou tepnou, přičemž její projevy mohou být akutní i chronické. Nejčastěji jsou postiženy velké a středně velké tepny- koronární artérie, aorta, tepny dolních končetin, krkavice a tepny Willisova okruhu. Klinicky se tedy ateroskleróza může projevit například jako akutní či chronická ischemická choroba srdeční, ischemická cévní mozková příhoda či ischemická choroba dolních končetin.

Důsledky arteriosklerózy, tedy tepenného tuhnutí, jsou komplexní. Jak bylo popsáno výše, arterioskleróza vede k remodelaci a hypertrofii. S věkem v důsledku hypertrofie narůstá šířka komplexu intimy a médiie. Během stárnutí v důsledku remodelace dochází k postupné dilataci a prodloužení elastických tepen. Tyto změny začínají již v adolescenci a ve věku 80 let je plocha aorty tři až čtyřikrát větší než ve dvaceti letech (Mitchell and Adams 1977). Narůstání délky aorty s věkem se týká primárně její ascendentní části, proto příliš neovlivňuje výsledek měření aPWV konvenčními metodami (Sugawara et al. 2008).

Jak bylo popsáno ve stati o odrazu vln, rychlost odražené vlny je závislá na tepenné tuhosti, která s věkem v důsledku arteriosklerózy narůstá. Podle literatury spadá odražená pulzová vlna u mladých jedinců do diastoly nebo pozdní systoly, čímž může napomáhat k udržování vyššího diastolického tlaku a tím i lepší koronární perfuzi. S věkem se zvyšuje rychlost šíření jak primární tak odražené vlny, ta se postupně přesouvá do časně systoly a u starších jedinců se sumuje s primární tlakovou vlnou, čímž navyšuje systolický TK. Typický tvar tlakových vln u mladých a starých jedinců je na obrázku 4.





**Obrázek 4** – Typický tvar tlakové vlny u mladého (a) a staršího jedince (b).

(a) křivky 22 letého muže; (b) křivky 78 leté ženy

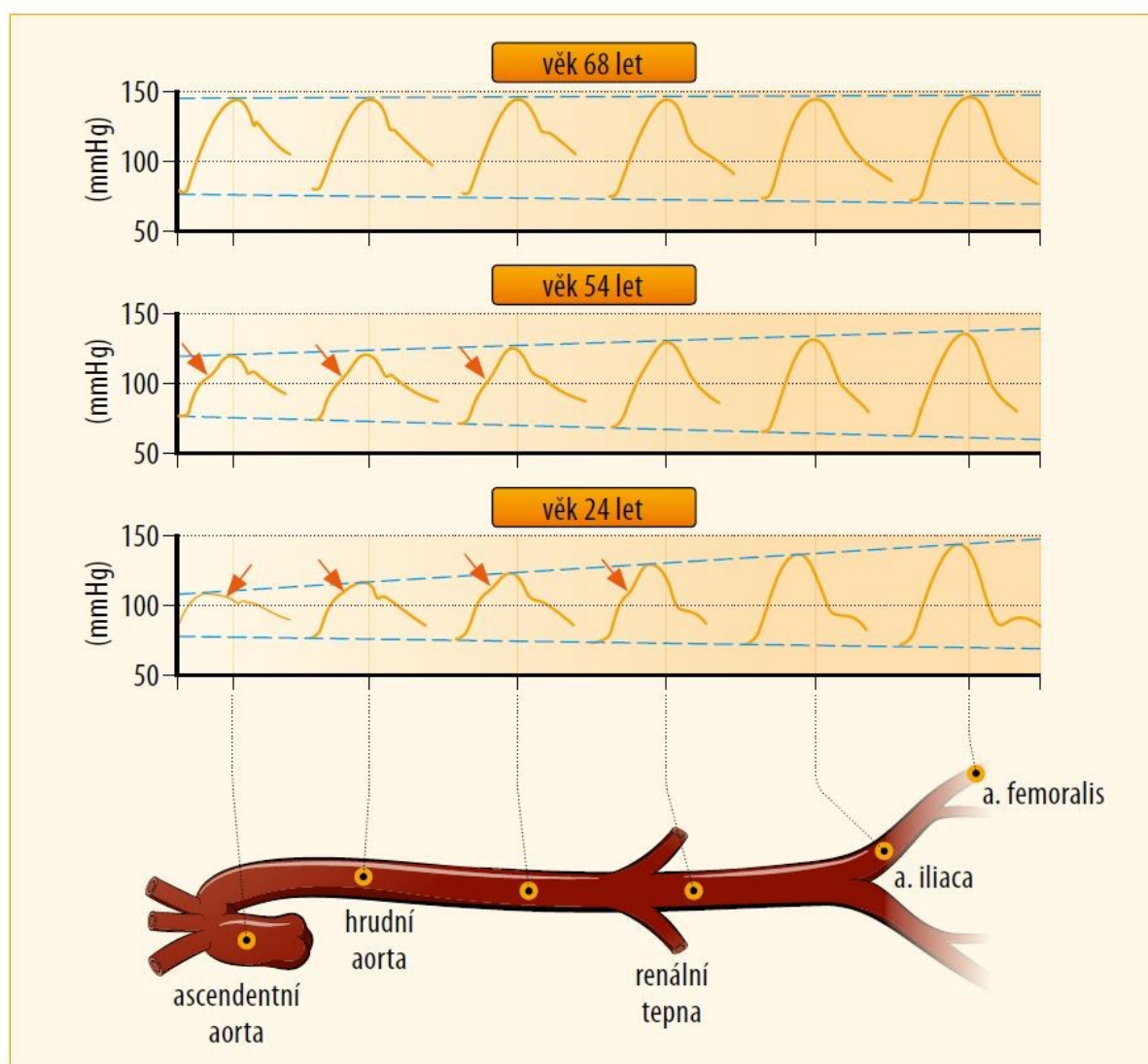
Graf vlevo zobrazuje tvar vlny snímané na radiální tepně, napravo v centrálním řečišti.

Vrchol primární vlny je na ose x označen číslem 1, vrchol odražené vlny číslem 2.

U mladého jedince odražená vlna nenavysuže pulzní tlak. U staršího jedince navyšuje odražená vlna pulzní tlak v centrálním i periferním řečišti, přičemž v centrálním řečišti ho navyšuje mnohem více.

Výsledky pozorování na II. Interní klinice FN Plzeň, převzato z Filipovský 2019.

Dalším pozorovaným fenoménem asociovaným se stárnutím tepenného řečiště je ztráta amplifikace krevního tlaku. U mladších jedinců může činit rozdíl mezi centrálním a periferním PP až 30 mmHg. S věkem se tato amplifikace snižuje a u osob nad 60 let může být systolický TK v centrálním a periferním řečišti shodný. Způsobuje to jak ztráta elasticity centrálních tepen, tak interakce mezi primární a odraženou tlakovou vlnou. Typický tvar tlakových vln v průběhu tepenného řečiště lze vidět na obrázku 5 (Nichols and O'Rourke 1998).



**Obrázek 5** – Tlakové vlny v průběhu tepenného řečiště u různě starých jedinců. U nejmladšího jedince se amplituda tlakové vlny zvyšuje distálně od srdce až o 60%. U nejstaršího jedince není tlaková amplifikace téměř žádná. Upraveno podle Nichols and O'Rourke 1998, převzato z Filipovský 2019

Klinicky vysoce významný je vliv progresivního tuhnutí centrálních tepen na srdce. Vychází ze dvou mechanismů - hemodynamického a mechanického propojení srdce a tepen. Důsledkem hemodynamického spojení je primárně zvýšení tlakového dotížení levé komory srdeční - afterloadu. S progresivním tuhnutím tepen dochází ke zvýšení jejich impedance, což znamená, že na vytvoření stejného proudu krve musí srdce vygenerovat vyšší tlak. Současně dochází k časnému návratu odražené vlny, která ještě více navyšuje systolický TK. Zvýšené tlakové dotížení levé komory vede k její remodelaci a hypertrofii. Tato remodelace je asociována s poruchou diastolické relaxace (Kaess et al. 2016) a zvyšuje plicní tlaky v diastole. Tyto zvýšené plicní tlaky vedou ke zvýšení tlaku v levé síni, což vede k její dilataci a zvýšenému riziku rozvoje fibrilace síní (Mitchell et al. 2007). Současně se zvyšuje i tlak v plicním řečišti, čímž se zvyšuje i afterload pravé komory, důsledkem čehož je její hypertrofie a dysfunkce. Novější koncept mechanického propojení srdce a aorty vyjadřuje vliv elastické aorty na diastolické plnění srdečních komor. Během systoly dochází kromě jiného i ke zkracování srdce v jeho dlouhé ose směrem k apexu, to vede k natáhnutí ascendentní aorty a zvýšení jejího napětí. Následně po ukončení kontrakce srdečních svalových vláken dochází k rychlému zkrácení ascendentní aorty do původní délky, což v časně diastole vede i k natahování srdce v jeho dlouhé ose. Tento mechanismus výrazně napomáhá diastolickému plnění komor (Bell et al. 2017). Jak ukázaly výsledky studie z Reykjavíku, postupná ztráta elasticity centrálních tepen s věkem vede k redukci systolického zkracování srdce v jeho dlouhé ose (Bell et al. 2015), což přispívá k rozvoji diastolické dysfunkce.

V neposlední řadě vede ztráta pružnickové funkce centrálních tepen k přenášení tlakových oscilací hlouběji do periferie. Flow MR vyšetření ukázalo, že pulzatilita v malých mozkových arteriích se s věkem zvyšuje (Vikner et al. 2020). Byla popsána asociace mezi touto zvýšenou pulzilitou a strukturálními změnami v bílé hmotě typickými u vaskulární demence (Jolly et al. 2013). Kromě přímého poškození mozku způsobené poškozením jeho mikrovaskulatury se ukazuje, že zvýšená pulzatilita napomáhá i zvýšené akumulaci amyloidu ve tkáních a tudíž se pravděpodobně spolupodílí i na rozvoji neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba (Hughes et al. 2013). Bylo popsáno, že zvýšená pulzatilita vede k reaktivním změnám jak v mikro, tak makro cirkulaci ledvin s měřitelným efektem na jejich funkci (Climie et al. 2018; Geraci et al. 2016; Loutzenhiser et al. 2002). Projevem stárnutí tepen tedy může být i přímé poškození vysokoprotokových orgánů způsobené zvýšenou pulzilitou v malých cévách.

## 1.7 Faktory ovlivňující progresi cévní tuhosti

Výše popsaný proces arteriosklerózy je významně asociován s věkem. U některých jedinců však může být akcelerován vícero mechanismy. Změny tepenné tuhosti jsou kumulativní a celoživotní, proto když je rizikový faktor dlouhotrvající a vysoce prevalentní, jeho asociace s tepennou tuhostí bude pravděpodobně taky silná.

### 1.7.1 Vliv arteriální hypertenze

Výše krevního tlaku je hned po věku druhým nejsilnějším korelátém tepenné tuhosti. Vztah mezi tuhnutím tepen a arteriální hypertenzí je komplexní a dosud je předmětem diskuzí. Z mechanického pohledu dochází při srdeční činnosti k opakovanému natahování a stahování elastických vláken o 5 až 10%, což vede k jejich opotřebování a frakturám. Při průměrné tepové frekvenci (TF) kolem 60/min se jedná denně přibližně o 85 tisíc cyklů. Toto natažení je vysoce závislé na MAP, který představuje průměrný tlak v tepenném řečišti působící roztažení tepny. Jak bylo popsáno výše, se zvyšujícím se tlakem je síla přenášena kromě elastických vláken i na tužší kolagenová vlákna, což vysvětluje závislosti tuhosti tepenné stěny na MAP. Dále je však důležitý i PP, jelikož čím je vyšší, tím větší je i rozsah natahování vláken, který vede k jejich rychlejšímu opotřebování. Celá tato interakce je navíc komplikována problematikou odrazu vln, jelikož s narůstající tuhostí dochází k dřívějšímu návratu odražené vlny a následnému navýšení centrálního PP, což dále akceleruje opotřebování elastinových vláken a tudíž i tepenné tuhnutí. Mezi arteriosklerózou a arteriální hypertenzí tedy existuje oboustranný zpětnovazebný vztah, kde zvýšení tuhosti vede k zvýšení PP, a zvýšení PP vede k další progresi tuhosti. (Humphrey et al. 2016)

Dlouhodobě byl všeobecně přijímán koncept, že arterioskleróza je orgánovou komplikací hypertenze počínající poruchou v periferním rezistenčním řečišti, která vede k zvýšení periferní rezistence a tudíž i MAP, čímž se zvýšeně degradují elastická vlákna v centrálním řečišti. Tuhnutí centrálních tepen bylo vnímáno jako důsledek dlouhotrvající hypertenze. Recentní studie zkoumající časový vztah mezi hypertenzí a tepenným tuhnutím však ukázaly, že vysoká tepenná tuhost při vstupním vyšetření predikovala progresi arteriální hypertenze a byla hlavním rizikovým faktorem jejího rozvoje (Kaess et al. 2012; Najjar et al. 2008). Tyto výsledky potvrzují, že mezi arteriosklerózou a arteriální hypertenzí existuje oboustranný vztah.

## 1.7.2 Faktory životního stylu

Vzhledem k výše popsanému bezprostřednímu propojení arteriální hypertenze a arteriosklerózy, faktory životního stylu se známým efektem na TK mají efekt i na cévní tuhost. Fyzická aktivita snižuje tepennou tuhost v závislosti na intenzitě a trvání cvičení, bez ohledu na to, jestli se jedná o vytrvalostní či odporový trénink (Way et al. 2019). Jestli je tento efekt krátkodobý a závislý pouze na snížení krevního tlaku, nebo je dlouhodobý a mediovaný jiným mechanismem, jako je například modulace sympatiku, je pořád předmětem zkoumání (Faconti et al. 2019).

Několik studií jak v dětské, tak dospělé populaci popsalo konzistentní asociaci mezi různými ukazateli obezity a tepennou tuhostí. Publikace pocházející z naší kliniky prokázala, že s přibývajícím počtem rizikových faktorů metabolického syndromu se tepenná tuhost zvyšuje lineárně (Vágovičová et al. 2015). U velkého vzorku dětí čítající téměř 16,5 tisíc probandů byl popsán alarmující nárůst PP přes pokles MAP s výraznou vazbou na BMI jako parametru obezity (Zachariah et al. 2014). Prospektivní studie zkoumající 3700 jedinců po šestnácti letech ukázala, že abdominální obezita je významným prediktorem akcelerovaného tepenného tuhnutí (Johansen et al. 2012). Longitudinální studie z Avonu sledující děti a jejich rodiče měřila několik parametrů obezity ve vztahu k tepenné tuhosti. Prokázala nejen to, že obezita je i u dětí významně asociovaná s aPWV, ale i to, že děti, které hubly, měly podobnou aPWV jako jejich vrstevníci s normální měřenou adipozitou, což nasvědčuje tomu, že vliv obezity na tepennou tuhost u dětí může být reverzibilní (Dangardt et al. 2019). Meta-analýza dvaceti intervenčních studií popsala efekt změny životního stylu a hubnutí na snížení aPWV i u dospělých (Petersen et al. 2015). Obezita je stav vyžadující vyšší průtok krve, to podněcuje aortální remodelaci na větší průměr. Jak bylo popsáno výše, elastin se tvoří primárně v časných stádiích života a během této remodelace se nový již nesyntetizuje. To vede ke změně relativního poměru kolagenu a elastinu v prospěch kolagenu, což se projeví nárůstem aPWV. Dále byl popsán negativní efekt hormonů produkovaných tukovou tkání na tepennou poddajnost (Singhal et al. 2002).

Výsledky studií sledujících vliv dyslipidémie na tepennou tuhost jsou rozporuplné. Byla popsána snížená tepenná poddajnost u dětí s familiární hypercholesterolémií (Lehmann et al. 1992). Práce sledující asymptomatické normotenzní děti s hypercholesterolémií našla významně zvýšenou tepennou tuhost u těchto dětí (i když



IMT byla normální), což nasvědčuje tomu, že zvýšená tepenná rigidita předchází rozvoji aterosklerotických plátů (Riggio et al. 2010). Analýza 41 publikací čítající téměř 23 tisíc jedinců však neprokázala asociaci mezi aPWV a jakýmkoliv parametrem lipidového metabolismu (Cecelja and Chowienczyk 2009).

Vliv soli na tepennou tuhost ukázaly výsledky studie, která srovnávala zdravou městskou a rurální populaci v Číně. Kromě jiného byla měřená aPWV a exkrece sodíku do moči. U venkovské populace byla aPWV významně nižší, přičemž hlavním rozdílem, kterému je připisován tento nálezn je strava s nižším obsahem soli ve venkovských oblastech (Avolio et al. 1985). Recentní analýza jedenácti intervenčních studií ukázala, že redukce příjmu soli vede ke snížení tepenné tuhosti (D'Elia et al. 2018).

Je třeba mít na paměti, že i když intervenční studie ukázaly efekt faktorů životního stylu na parametry cévní tuhosti, tento efekt je pravděpodobně minimálně zčásti závislý na současné redukci krevního tlaku.

### 1.7.3 Vliv kalcifikace

Mezi kalcifikací aorty a její tuhostí existuje pozitivní asociace, i když není v současnosti jisté, jestli je kalcifikace důsledkem anebo příčinou zvýšené tuhosti (Tsao et al. 2014). S postupujícím věkem narůstá aPWV jako parametr tepenné tuhosti, a to i před dosažením středního věku, kdy lze běžně pozorovat první známky kalcifikace, což nasvědčuje tomu, že kalcifikace je pozdním důsledkem poškození aorty. Dále však bylo v prospektivní studii prokázáno, že kalcifikace akceleruje tepenné tuhnutí (Guo et al. 2017). Vztah mezi tuhostí centrálních tepen a jejich kalcifikací bude tedy velice pravděpodobně oboustranný, vedoucí k bludnému kruhu poškození tepny s následnou kalcifikací, která vede k tuhnutí vedoucímu k dalšímu poškození.

Kalcifikace tepenné médie byla dlouho považována za pasivní degenerativní proces a klinickou známkou pokročilého poškození orgánů při ateroskleróze, onemocnění ledvin či diabetu mellitu. V současné době se však na kalcifikaci pohlíží jako na aktivní a vysoce regulovaný proces podobný embryonální tvorbě kostí, který by mohl být reverzibilní.

Matrix Gla-protein (MGP) je produkován buňkami hladké svaloviny médie a je silným přirozeným inhibítorem vaskulární kalcifikace (Shanahan et al. 1998). V syntéze zralé formy tohoto proteinu se významně uplatňuje vitamin K, který slouží jako kofaktor enzymu, který mění glutamát na  $\gamma$ -carboxyglutamát (Gla), který je schopný vázat vápník.

Bez této transformace není MGP schopný interagovat s intravaskulárním vápníkem. Dále MGP podléhá fosforylaci, která posiluje jeho extracelulární sekreci. V krvi lze zachytit různě zralé formy MGP. Současná data ukazují, že nefosforylovaná a nekarboxylovaná forma MGP (dp-uc MGP) je nepřímě úměrná hladině vitamínu K, ale naopak přímo úměrná kalcifikací koronárních tepen (Dalmeijer et al. 2013). Recentní publikace z našeho pracoviště dále popsala asociaci mezi touto formou MGP a zvýšenou tepennou tuhostí v obecné populaci (Mayer et al. 2016a). V neposlední řadě se na celé problematice podílí i hladina vitamínu D. Byla popsána asociace mezi nízkou hladinou vitamínu D a vyšší aPWV (Mayer et al. 2012) a dokonce i synergistický efekt hladin vitamínu D a K na aPWV (Mayer et al. 2017).

#### 1.7.4 Vliv parametrů glukózového metabolismu

Diabetes mellitus (DM) je významným rizikovým faktorem kardiovaskulární mortality. Jak ukazuje narůstající množství důkazů, i vyšší hladina glykémie nedosahující ještě hranice pro diagnózu DM, může být negativním prognostickým faktorem pro fatální kardiovaskulární příhody (Ferrannini et al. 2020). S nárůstem tepenné tuhosti je asociován jak manifestní DM, tak už prediabetické stavy (Prenner and Chirinos 2015). Patofyziologické působení hyperglykémie na cévní stěnu je komplexní a způsobuje ho několik přepojených mechanismů: zvýšený intracelulární metabolismus glukózy, dysfunkce intracelulární signalizace, změna osmotické rovnováhy a produkce toxických metabolitů - produktů pokročilé glykace, tzv. advanced glycation end-products (AGEs) (Barrett et al. 2017). AGEs jsou heterogenní skupina vysoce oxidovaných molekul vznikající neenzymatickou glykací mezi redukujícími cukry a proteiny, lipidy či nukleovými kyselinami. Vznikají už za podmínek normoglykémie, ale jejich vznik je výrazně akcelerován se závažností a délkou trvání hyperglykémie. Bylo identifikováno několik desítek AGEs a dělí se podle schopnosti tvořit spojky mezi proteiny a podle toho, jestli fluoreskují pod UV zářením (Ahmed 2005). Jejich významná role byla nalezena v patogenezi mnoha chronických nemocí, jako například diabetu (Goldin et al. 2006), chronického onemocnění ledvin, aterosklerózy (Kalousova et al. 2005), či u neurodegenerativních onemocnění (Salahuddin et al. 2014). Nejvíce prozkoumaným a nejčastěji používaným představitelem AGEs je karboxymethyl lyzin (CML). Patofyziologický účinek AGEs je jednak přímý, kdy navázání cukru vede k modifikaci

fyzikálních, chemických či strukturálních vlastností proteinů nebo lipidů. Tímto způsobem dochází v médiu cévy k tvorbě příčných můstků mezi kolagenními vlákny, ty se stávají rezistentnější k enzymatické proteolýze, což vede k zvýšení tepenné tuhosti. Působení AGEs je však zprostředkováno i pomocí receptorů. Prvním objeveným a nejvíce prozkoumaným receptorem je tzv. receptor pro AGEs- RAGE. RAGE je transmembránový protein, který je kromě AGEs aktivován i jinými peptidovými ligandy, např. amfoterinem, leukocytovými integríny či amyloidovými fibrilami. RAGE je exprimován na povrchu řady buněk - v plicích, mozku, byl nalezen na povrchu leukocytů, endoteliálních buněk či buněk hladké svaloviny cév. Jeho aktivace vede k aktivaci NADPH oxidázy, čím se extracelulárně generuje vysoké množství kyslíkových radikálů. Dále se spouští složitá intracelulární signální kaskáda, na jejíž konci je iniciace zánětu, zvýšení oxidačního stresu a endoteliální permeability či inhibice syntézy oxidu dusného. Všechny tyto mechanismy vedou k akceleraci aterosklerózy i k zvyšování cévní rigidity.

Kromě celulárně vázaného RAGE existuje i v krvi cirkulující forma tohoto receptoru, která vzniká dvěma mechanismy. Endogenní sekrecí RAGE do krve vzniká tzv. esRAGE. Odštěpením celulárního receptoru z buňky pomocí metaloproteináz vzniká tzv. odštěpený, neboli cleaved RAGE (cRAGE). Obě tyto formy se společně nazývají rozpustné RAGE, neboli soluble RAGE (sRAGE). Tyto sRAGE kolují v krvi, kde vychytávají a neutralizují cirkulující AGEs, čímž brání jejich patofyziologickému účinku, včetně tvorby příčných můstků mezi kolagenními vlákny. (Koyama et al. 2007)

Několik studií identifikovalo asociaci mezi všemi složkami AGE-RAGE osy a parametry tepenné tuhosti. Na jedné straně byla popsána vyšší aPWV u jedinců s vyšší hladinou AGEs (McNulty et al. 2007; Semba et al. 2009), na straně druhé byla popsána inverzní asociace mezi koncentrací sRAGE a aPWV (Dimitriadis et al. 2013; Mayer et al. 2016b). V zvířecích modelech na geneticky modifikovaných diabetických myších léčených rekombinantním sRAGE došlo k regresi aterosklerotického procesu závislé na dávce sRAGE. Tento efekt byl nezávislý na glykemickém a lipidovém stavu, což svědčí pro významnou protektivní roli sRAGE (Park et al. 1998).

### 1.7.5 Genetické faktory

Genetické faktory ovlivňující tepenné vlastnosti jsou předmětem intenzivního studia. Rozsáhlá celogenomová asociační studie (genome-wide association study - GWAS),



provedená jako součást Framinghamské studie na kohortě potomků, ukázala, že parametry centrální hemodynamiky, včetně aPWV, vykazují známky multifaktoriální dědičnosti (Mitchell et al. 2005). V jedné ze studií provedené na našem pracovišti jsme prokázali, že potomci hypertoniků, kteří nemají ještě vyvinutou hypertenzi, mají vyšší aortální rigiditu než normotenzní potomci normotenzních rodičů z kontrolní skupiny (Kučerová-Seidlerová et al. 2006). Kandidátní geny, které jsou předmětem zkoumání a mohly by mít vliv na progresi tepenné tuhosti, jsou primárně geny zapojené do angiogeneze, dále geny kódující strukturu a remodelaci extracelulární matrix a v neposlední řadě působky zprostředkující interakci mezi touto matrix a buněčnou komponentou tepenné stěny. Byly proto provedené studie různých genů kódujících složky systému renin-angiotenzin-aldosteron (Benetos et al. 1996), polymorfismy genu pro syntázu oxidu dusnatého (Mayer et al. 2010) či genu pro adducin - cytoskeletálního proteinu podílejícího se na regulaci sodíkové rovnováhy (Seidlerová et al. 2009).

#### 1.7.6 Farmakoterapie

Ve vztahu k tepenné tuhosti existuje několik lékových skupin s prokázaným či potenciálním efektem na její modulaci. Jako první možnost se vzhledem k již popsanému úzkému propojení cévní rigidity a aktuálnímu TK nabízí antihypertenziva. Při sledování čtyřleté mortality u 150 nemocných v chronickém dialyzačním programu bylo prokázáno, že aortální rigidita může být léčebně ovlivněna nezávisle na TK, a že aPWV byla v této skupině pacientů významným, na TK nezávislým, prediktorem mortality (Guerin et al. 2001). V jiné studii byl srovnáván efekt různých skupin antihypertenziv na periferní a centrální TK. Skupině 32 hypertoniků byl v náhodném intervalu postupně podáván betablokátor (BB), ACE inhibitor (ACEi), blokátor kalciového kanálu (BKK), diuretikum a placebo. Výsledky ukázaly, že ACEi snižuje centrální TK více než periferní, BKK a diuretikum snižuje centrální a periferní TK obdobně a BB snižuje centrální TK výrazně méně než periferní (Morgan et al. 2004). Podobný efekt byl následně prokázán i ve vztahu k parametrům tepenné tuhosti, kde byla nejsilnější asociace s aPWV pozorována při ACEi a blokátorech receptoru pro angiotenzin II (Ong et al. 2011). Tyto výsledky nabízí vysvětlení pro výrazný rozdíl v celkové a kardiovaskulární mortalitě nalezený ve studii ASCOT. V ní byli hypertonici s vysokým rizikem randomizováni na léčbu buď BB a event. diuretikem, a nebo BKK a event. ACEi, přičemž léčba BKK s ACEi vedla

k výraznější redukci kardiovaskulární mortality, a to přesto, že měřený periferní TK byl snížen obdobně při obou léčebných režimech (Dahlöf et al. 2005).

Ke zpomalení progresu kalcifikace a tudíž i tepenného tunutí se vzhledem k výše popsanému mechanismu jeví slibně substituce vitamínu K a vitamínu D. Naopak bylo prokázáno, že užívání warfarinu, jehož efekt spočívá v inhibici vitamínu K při tvorbě  $\gamma$ -carboxyglutamátu, zrychluje progresi arteriosklerózy a zvyšuje mortalitu u nemocných s chronickým renálním selháváním (Mac-Way et al. 2014). Další slibnou skupinou léků, které by mohly zvrátit kalcifikaci tepen, jsou bisfosfonáty. Bylo prokázáno, že blokují formaci apatitových krystalů, inhibují metaloproteinázy a expresi zánětlivých parametrů. Bylo ukázáno, že zpomalují progresi vaskulární kalcifikace u nemocných v terminálním stádiu renálního selhání, jejich vliv na aPWV však dosud nebyl dostatečně prozkoumán (Caffarelli et al. 2017).

Vzhledem k výrazné asociaci mezi tepennou tuhostí a DM byl intenzivně zkoumán i efekt antidiabetik a léků zasahujících do AGE-RAGE osy. Byl prokázán pozitivní efekt empagliflozinu na tepennou tuhost (Chilton et al. 2015); jestli je tento efekt podmíněný pouze redukcí TK zůstává předmětem diskuzí. Recentní meta-analýza 26 publikací sledujících vliv nových perorálních antidiabetik na aPWV poukázala na pozitivní efekt agonistů GLP-1 receptoru, inhibitorů SGLT-2 a inhibitorů dipeptidil peptidázy-4 (Batzias et al. 2018), heterogenita výsledků zkoumaných studií však byla značná. Stran inhibice patologického efektu AGE-RAGE osy byly zkoumány léky aminoguanidin a alagebrium. Aminoguanidin brání vzniku AGEs, avšak jeho výzkum byl zastaven v třetí fázi klinického testování pro zvýšené riziko nežádoucích účinků a neprokázání jeho účinnosti (Engelen et al. 2013). Alagebrium štěpí příčné můstky, cross-linky, mezi glukózou a aminoskupinami bílkovin. Preklinické studie na zvířatech ukázaly působivý efekt v redukcii tepenné tuhosti a zlepšení hemodynamických parametrů (Wolffenbittel et al. 1998). Následné klinické testy na lidské populaci však přinesly rozporuplné výsledky. Na jedné straně byl popsán příznivý efekt na augmentační index a FMD (Zieman et al. 2007), na druhé straně nebyl nalezen žádný pozitivní efekt na toleranci zátěže či zlepšení srdeční funkce u nemocných s chronickým srdečním selháním (Little et al. 2005). V další prospektivní studii nebyl u seniorů po roce intervence prokázán jeho efekt na FMD či aPWV (Oudegeest-Sander et al. 2013).

## 2 Hypotézy a cíle práce

Základním cílem naší analýzy bylo hledat jak potenciální asociace zvýšené tuhosti cévní stěny v rámci průřezové studie, tak prediktory zvýšeného věkem podmíněného tuhnutí cévní stěny na základě osmiletého pozorování. Zkoumali jsme metabolické a genetické faktory, které mohou potenciálně urychlit či zpomalit tento dynamický proces. Z metabolických faktorů jsme se zaměřili zejména na faktory glukózového metabolismu a byly stanoveny následující otázky:

- Který parametr glukózového metabolismu vykazuje nejsilnější asociaci s aPWV v průřezové studii na vzorku obecné populace? Tato otázka je řešena v **příloze č. 1** „Sérové biomarkery a autofluorescenční metodou měřeny kožní AGEs. Který parametr nejlépe ilustruje vztah mezi produkty pokročilé glykace a tepennou tuhostí na vzorku obecné populace?“
- Existuje asociace mezi koncentrací solubilního receptoru pro produkty pokročilé glykace a věkově podmíněným vzestupem tuhosti centrálních tepen v longitudinální studii? Tato otázka je řešena v **příloze č. 2** „Nezávislá asociace mezi sRAGE a věkově podmíněným vzestupem tuhosti centrálních tepen“
- Který z parametrů AGE-RAGE osy je v prospektivní studii nejsilnějším prediktorem akcelerovaného věkem podmíněného tuhnutí centrálních tepen? Tato otázka je řešena v **příloze č. 3** „Úloha produktů pokročilé glykace ve stárnutí cév. Který z parametrů je nejvhodnějším biomarkerem?“

Vedlejším předmětem zkoumání byl vliv hladiny vitamínu K a vybraných genetických polymorfismů na progresi tuhosti cévní stěny během osmiletého sledování. Byly položeny následující otázky:

- Existuje asociace mezi hladinou vitamínu K a vzestupem rychlosti aortální pulzní vlny? Tato otázka je zkoumána v **příloze č. 4** „Vitamin K ovlivňuje individuální rychlost vzestupu aPWV“
- existuje asociace mezi vybranými SNP a vzestupem rychlosti aortální pulzní vlny? Tato otázka je zkoumaná v samostatné části v oddílu výsledky.

## 3 Materiál a metodika

### 3.1 Design studie a studovaná populace

Všechny publikované práce vycházely z dat získaných z průřezových studií Czech post-MONICA. Jedná se o pokračování projektu WHO MONICA (MONItoring trends and determinants in CArdiovascular disease), jehož cílem bylo určit klíčové rizikové parametry kardiovaskulárních chorob (Tunstall-Pedoe et al. 1999). V České republice studie probíhá opakovaně od roku 1985, naše klinika se do projektu zapojila již v roce 1997. 1% obyvatel ve věku 25-75 let okresu Plzeň-město bylo opakovaně náhodně vybráno z Centrálního registru pojištěnců a pozváno k vyšetření kardiovaskulárních rizikových faktorů.

Pro účely této disertační práce byla použita primárně data nasbíraná během vyšetření v letech 2008 a 2017. Dále na naší klinice proběhlo v letech 2016-2018 kontrolní vyšetření probandů zapojených do průřezové studie v roce 2008. Celkově tedy proběhla 3 šetření.

Studie v roce 2008 se zúčastnilo celkem 1103 probandů, kontrolní vyšetření stejného vzorku populace probíhalo v letech 2016-18. Do kontrolního vyšetření se 115 probandů přestěhovalo a 87 zemřelo. K tomuto vyšetření bylo tedy pozváno 901 probandů, k vyšetření jich dorazilo celkem 632 (57,3% ze vstupního vzorku, 70,1% ze všech pozvaných). Další samostatná průřezová studie na nezávislém vzorku populace proběhla na podzim v roce 2017 a zúčastnilo se jí celkem 399 jedinců. Všechna vyšetření byla provedena dle standardizovaného protokolu studie MONICA (Cífková et al. 2011), přičemž navíc proběhlo na našem pracovišti vyšetření tuhosti centrálních tepen pomocí měření rychlosti aortální pulzové vlny a od roku 2016 taky vyšetření autofluorescence kůže ke stanovení depozice produktů pokročilé glykace.

První publikace byla průřezová studie a vznikla sloučením dat nasbíraných během kontrolního vyšetření první kohorty studie post-MONICA v letech 2016-18 a vyšetřením odlišného vzorku populace v rámci studie Czech post-MONICA 2017, jelikož vyšetřovací protokoly byly během obou vyšetření v podstatě identické. Vznikl tím vzorek o velikosti 1031 vyšetřených, pro chybějící či nepřesné měření aPWV bylo ze studie vyřazeno 164 probandů a finální analyzovaný vzorek čítal 867 jedinců. Pro účely druhé, třetí a čtvrté publikace byla použita data z kohortové prospektivní studie nasbírané v letech 2008 (vstupní vyšetření) a 2016-18 (kontrolní vyšetření), přičemž konečný vzorek čítal 632 probandů. Pro chybějící či inkompletní data proběhly finální analýzy na 530 jedincích.

### 3.2 Vyšetření a laboratorní metody

Všechny vyšetřovací procedury probíhaly dle standardizovaného protokolu studie Czech post-MONICA. Dotazníkovým šetřením byla zjišťována demografická a anamnestická data se zaměřením na kardiovaskulární systém (anamnéza kardiovaskulárního onemocnění, faktory životního stylu jako kouření, dietní zvyklosti, pohybová aktivita, škála HADS pro úzkost a depresi atd.), dále byla zjišťována aktuální farmakoterapie. Antropometrické údaje byly získány změřením výšky a tělesné hmotnosti pomocí váhy SECA 767 (SECA GmbH&co, Hamburg, Německo), dále byl změřený obvod pasu a boků. Krevní tlak byl měřen auskultační metodou s použitím manžety přiměřené velikosti po sezení trvajícím minimálně 5 minut. Celkově proběhla 3 měření krevního tlaku, konečná hodnota byla stanovena jako průměr druhého a třetího měření. Střední arteriální tlak byl vypočítán jako  $1/3$  systolického tlaku +  $2/3$  diastolického tlaku. Kouření bylo definováno jako pozitivní anamnestický údaj nebo více než 10 ppm CO ve vydechaném vzduchu měřeném přístrojem Micro<sup>+</sup> Smokerlyzer (Bedfont Scientific Ltd, Maidstone, Velká Británie). Měření autofluorescence kůže pomocí přístroje AGE Reader mu (Diagnoptics Technologies V.V., Groningen, Holandsko) byla pomocí zprůměrování tří měření neinvazivně stanovena depozice specifických produktů pokročilé glykace v kůži (pentosidin, N<sup>ε</sup>-carboxymethyl lysin a N<sup>ε</sup>-carboxyethyl lysin). Příklad AGE Reader mu lze vidět na obrázku 6.

Krevní vzorky byly nabírány po minimálně 12 hodinách lačnění. Celkový a HDL cholesterol, triglyceridy, sérová hladina kreatininu a glykémie byly stanoveny použitím analyzátoru Cobas Mira/ROCHE (ROCHE Diagnostics, Basel, Švýcarsko). K výpočtu LDL cholesterolu byla použita Friedewaldova rovnice ( $LDL = \text{celkový cholesterol} - HDL - (TG/2,22)$ ). Glomerulární filtrace byla odhadnuta ze sérové hladiny kreatininu použitím vzorce CKD-EPI, který zohledňuje věk a pohlaví. Glykovaný hemoglobin byl stanoven pomocí kapalinové chromatografie. Koncentrace sRAGE a CML byla stanovena Oddělením imunochemické diagnostiky FN Plzeň pomocí metody ELISA použitím komerčních kitů - Human RAGE Quantikine ELISA Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) a Human Carboxymethyl lysine, CML ELISA Kit (Cusabio Technology LLC, Houston, Tx, USA). Dp-ucMGP byl stanoven použitím komerčního kitu InaKtif MGP iSYS Kit (IDS, Boldon, UK), založeném na dual antibody ELISA kitu vyvinutém VitaK (Maastricht University, Maastricht, Holandsko).

DNA ke genotypizaci byla izolována z leukocytů periferní krve (buffy coat) pomocí NucleoSpin Blood Mini kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Německo) použitím protokolu stanoveného výrobcem a kvantifikována spektrofotometricky použitím přístroje NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Vybrané SNP byly detekovány pomocí TaqMan® SNP Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific) na přístroji Corbett Rotor-Gene 6000 instrument (Corbett Life Science, Concord, NSW, Australia).

Konvenční kardiovaskulární rizikové faktory byly kategorizovány podle Společných evropských doporučení pro prevenci kardiovaskulárních chorob (Piepoli et al. 2016). BMI (index tělesné hmotnosti) byl vypočítán podělením tělesné váhy (kg) druhou mocninou výšky (m), nadváha byla stanovena jako  $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$  a obezita  $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ . Arteriální hypertenze byla stanovena jako TK  $\geq 140/\geq 90$  nebo užívání antihypertenzní medikace. Jako manifestní DM byla brána hodnota lačné glykémie  $\geq 7,0 \text{ mmol/L}$  nebo užívání antidiabetické terapie, za patologickou byla považována hladina glykovaného hemoglobinu  $\geq 42 \text{ mmol/mol}$ . Hypercholesterolemie byla definována jako LDL  $\geq 2,5 \text{ mmol/L}$ , hypertriglyceridémie jako TG  $\geq 1,7 \text{ mmol/L}$  a renální insuficience jako eGFR  $< 60 \text{ ml/min}$ .



**Obrázek 6** – Přístroj AGE Reader mu měřící autofluorescenci kůže použitý k neinvazivnímu stanovení kožní depozice AGEs



### 3.3 Měření tuhosti centrálních tepen

Jelikož vstupní vyšetření probíhalo v roce 2008, měření tuhosti centrálních tepen se řídilo podle staršího dokumentu o konsenzu odborníků na arteriální tuhost z roku 2006 (Laurent et al. 2006). Měření probíhalo po 15 minutovém odpočinku vleže na lůžku neinvazivní metodou aplanační tonometrie použitím přístroje Sphygmocor MM3 (AtCor Medical Ltd., Sydney, NSW, Australia). Záznam pulzních vln proběhl na pravostranné arteria carotis communis a arteria femoralis. Před samotným měřením pulzních vln proběhla kalibrace přístroje pomocí krevního tlaku na kontralaterální horní končetině. Na povrchu těla byly změřeny vzdálenosti mezi místem pulzace krkavice a fossa jugularis, následně mezi f. jugularis a místem pulzace stehenní tepny. Celková uražená distance pulzní vlny byla vypočítána rozdílem těchto naměřených vzdáleností. Samotný záznam pulzních vln probíhal za současné registrace EKG, díky tomu se může kvantifikovat časový rozdíl mezi začátkem pulzní vlny na karotidě a a. femoralis. Rychlost aortální pulzní vlny se v závěru vypočítá jako poměr vzdálenosti a času. U každého jedince proběhla minimálně dvě měření. Pokud byl výsledek mezi měřeními větší než 0,5 m/s, proběhla další registrace aPWV. Pro potřeby analýzy prospektivní studie byla ještě vypočítána intraindividuální změna aPWV za rok pomocí vzorce:

$$\Delta PWV / \text{rok} = \frac{aPWV \text{ při druhém vyšetření (m/s)} - aPWV \text{ při vstupním vyšetření (m/s)}}{\text{čas mezi vyšetřeními (rok)}}$$



**Obrázek 7** – Přístroj Sphygmocor MM3 použitý při neinvazivním měření aPWV.

### 3.4 Statistická analýza

Pro management databází byl použit software MS Access a MS Excel verze 14.0 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA), pro statistickou analýzu software SAS verze 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Data jsou prezentována jako medián (interkvartilové rozpětí) nebo počet (procentuální zastoupení) nebo průměr  $\pm$  směrodatná odchylka při gaussovsky rozložených proměnných.

Univariátní analýzou jsme zjistili, že rozložení aPWV a většiny dalších parametrů nemělo gaussovské rozložení. Při porovnávání baseline a follow-up hodnot byl proto použit Wilcoxonův párový test, u kategorických proměnných McNemarův test, při korelačních analýzách Spearmanův korelační koeficient. Dále proběhla série lineárních a logistických regresních modelů s použitím  $\Delta$ PWV/rok jako závislé proměnné v druhé, třetí a čtvrté práci. Jelikož první práce je průřezová studie, jako závislá proměnná byla použita hodnota aPWV. Všechny modely byly plně adjustovány na známé kardiovaskulární rizikové faktory a to jako kontinuální proměnné v lineárních a kategorické proměnné v logistických analýzách.

### 3.5 Etické aspekty

Před zařazením do studie podepsali všichni vyšetření jedinci opakovaně informovaný souhlas - jak při vstupním vyšetření, tak i před kontrolním vyšetřením. Vyšetření proběhla podle zásad dobré klinické praxe a pacienti je podstoupili dobrovolně. Studie byla projednána a schválena lokální etickou komisí. Všechna data jsou skladována v souladu se zákonem na ochranu osobních dat a Evropské směrnice GDPR .



## 4 Výsledky

Výsledky jednotlivých analýz podle položených vědeckých otázek jsou uvedené v následující části práce. Do hloubky jsou výsledky rozebírány a diskutovány v příložených publikacích. Stať 4.1 vychází z průřezových dat. Všechny ostatní výsledky vychází z longitudinálního šetření.

### 4.1 Asociace mezi parametry glukózového metabolismu a cévní tuhostí - výsledky průřezové studie

Sloučením dat nasbíraných během kontrolního vyšetření první kohorty post-MONICA v letech 2016-18 a samostatné průřezové studie post-Monica v roce 2017 vznikl vzorek o velikosti 1031 jedinců reprezentující obecnou populaci okresu Plzeň- město. Po vyřazení 164 probandů pro chybějící data byla na výsledném vzorku 867 probandů hledána asociace mezi cévní tuhostí a různými parametry glukózového metabolismu, jmenovitě lačnou glykemií, HbA1c, CML, AGEs v kůži, sRAGE a jejich poměru. Použitím lineárních a logistických regresních modelů s aPWV jako závislou proměnnou, byla hledána asociace při hladině významnosti  $p < 0,05$ , a to jak pro celou studovanou populaci, tak po vyřazení diabetických jedinců. Analyzovaný vzorek tvořilo 477 žen (55% vzorku), 75 diabetiků (8,7%), průměrný věk byl 56,7 let, průměrná aPWV byla 8,76 ( $\pm 2,19$ ) m/s. Průměrné hodnoty vybraných parametrů glukózového metabolismu byly: lačná glykémie 5,40 ( $\pm 0,93$ ) mmol/L, HbA1c- 37,3 ( $\pm 6,55$ ) mmol/mol, CML 216,4 ( $\pm 204,7$ ) pg/mL, AGEs v kůži 2,26 ( $\pm 0,57$ ) AU, sRAGE 1084,0 ( $\pm 464,1$ ) pg/mL, poměr CML a sRAGE ( $\times 1000$ ) 247,2 ( $\pm 321,5$ ) a poměr AGEs v kůži se sRAGE ( $\times 1000$ ) 2,52 ( $\pm 1,69$ ).

Při analýze celého vzorku byla zjištěna nejsilnější asociace mezi aPWV a lačnou glykemií, AGEs v kůži a HbA1c ( $p < 0,0001$  pro všechny jmenované parametry) a poměrem podkožních AGEs se sRAGE ( $p = 0,001$ ), a to i po komplexní adjustaci na farmakoterapii a další rizikové faktory (věk, kouření, arteriální hypertenzi, BMI, atd.). Signifikantní asociace byla dále nalezena i s koncentrací sRAGE ( $p = 0,041$ ). Žádná asociace nebyla nalezena s CML či s poměrem CML/sRAGE. Velice podobné výsledky byly nalezeny i po vyřazení diabetických jedinců z testování, s výjimkou HbA1c, který ztratil svou prediktivní hodnotu - tabulka 4.1. Blíže jsou tyto výsledky rozebrány v **příloze 1**.

**Tabulka 4.1** - Mnohočetná lineární regrese mezi rychlostí aortální pulzní vlny a vybranými parametry glukózového metabolismu

	Celý vzorek (n=867)		Nediabetičtí jedinci (n=792)	
	$\beta$ coeff. (std. error)	p	$\beta$ coeff. (std. error)	p
<b>Individuální modely:</b>				
Lačná glykémie	0,4195 (0,0718)	<0,0001	0,4882 (0,1013)	<0,0001
HbA1c	0,0487 (0,0116)	<0,0001	-0,0027 (0,0163)	0,8683
sRAGE	-0,0003 (0,0001)	0,041	-0,0004 (0,0001)	0,006
CML	-0,0001 (0,0003)	0,901	-0,0002 (0,0003)	0,536
AGEs v kůži	0,5151 (0,1341)	<0,0001	0,3195 (0,1355)	0,017
Poměr CML a sRAGE	0,0001 (0,0002)	0,619	0,0001 (0,0001)	0,788
Poměr AGEs v kůži a sRAGE	0,1256 (0,0372)	0,001	0,1092 (0,0366)	0,003

Výsledek multivariátní lineární regrese s použitím aPWV jako závislé kontinuální proměnné. Každý ze 7 parametrů byl testován v samostatném modelu, všechny modely byly adjustovány na: věk, pohlaví, anamnézu CVD, kouření, BMI, MAP, LDL cholesterol, eGFR dle CKD-EPI výpočtu, léčbu antihypertenzivy, statiny či antidiabetiky (nepoužito při analýze nediabetických jedinců)

## 4.2. Souhrn základních výsledků prospektivní studie

Všechny další výsledky vycházejí z analýz longitudinálních dat získaných vyšetřením kohorty obecné populace sledované mezi lety 2008 až 2018. Vstupního vyšetření v roce 2008 se zúčastnilo celkem 1103 probandů, kontrolní vyšetření stejného vzorku populace probíhalo v letech 2016-18. Do kontrolního vyšetření se 115 probandů přestěhovalo a 87 zemřelo, pozváno tedy bylo 901 probandů, k vyšetření jich dorazilo celkem 632 (57,3% ze vstupního vzorku, 70,1% ze všech pozvaných). Průměrná doba mezi vstupním a kontrolním vyšetřením byla 8,3 let, průměrný nárůst aPWV byl o 1,45 m/s, což odpovídá 0,18 m/s za rok. Průměrný věk probandů při vstupním vyšetření byl 54,7 let, muži tvořili 47,1% souboru (288 jedinců). Základní charakteristika celého sledovaného souboru je blíže popsána v **tabulce 4.2**.

Korelační analýzou mezi  $\Delta$ PWV/rok a konvenčními i nekonvenčními kardiovaskulárními rizikovými faktory při vstupním vyšetření byla nalezena nejsilnější korelace s věkem (Spearmanův korelační koeficient=0,14, p=0,001) a sRAGE (Spearman -0,18, p<0,0001). Použitím step-wise lineárních regresních modelů byl nejsilnějším prediktorem progresu cévního tuhnutí věk (p=0,003), MAP (p=0,016) a koncentrace sRAGE (p=0,021). Další zkoumání bylo zaměřeno na problematiku vlivu sRAGE, AGE-RAGE osy a vitamínu K, a je blíže rozebráno v následujících oddílech a samostatných přílohách.

**Tabulka 4.2-** Základní charakteristika studované populace [medián (Q1-Q3 rozpětí) nebo počet (procentuální zastoupení)]

	Vstupní vyšetření	Kontrolní vyšetření	Rozdíl
Věk [roky]	56,5 (44,9-65,1)	64,4 (52,9-73,9)	8,0 (7,6-9,2)*
Pohlaví [počet (%) mužů]	288,0 (47,1%)	288 (47,1%)	-
Historie CVD [%] <sup>#</sup>	37 (6,0%)	80 (13,1%)	43 (7,1%)*
Kouření [počet (%)]	179 (29,2%)	112 (18,3%)	-67 (-10,9%)*
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	26,9 (23,9-29,9)	27,5 (24,5-31,0)	0,7 (-0,4-2,0)*
Systolický TK [mmHg]	126,7 (116,7-137,3)	132,0 (122,0-144,5)	5,8 (-5,0-15,5)*
Diastolický TK [mmHg]	80,7 (75,3-86,7)	80,0 (74,0-87,0)	-0,7 (-6,7-6,3)
Střední art. tlak [mmHg]	96,0 (90,0-103,3)	97,7 (91,5-105,7)	2,0 (-5,4-8,7)*
Hypertenze [počet (%)] <sup>§</sup>	281 (45,9%)	402 (65,8%)	121 (19,9%)*
Antihypertenziva [počet (%)]	197 (32,2%)	302 (49,3%)	105 (17,1%)*
Celkový cholesterol [mmol/L]	5,19 (4,55-5,77)	5,1 (4,45-5,79)	0,1 (-0,5-8,7)
LDL cholesterol [mmol/L]	3,08 (2,49-3,63)	2,9 (2,32-3,51)	-0,02 (-0,63-0,41)
Léčba statiny [počet (%)]	82 (13,4%)	160 (26,1%)	78 (12,7%)*
Lačná glykémie [mmol/L]	5,1 (4,8-5,5)	5,1 (4,8-5,7)	0,1 (-0,3-0,5)
Antidiabetika [počet (%)]	15 (2,5%)	62 (10,1%)	47 (7,6%)*
Diabetes [počet (%)] <sup>+</sup>	29 (4,7%)	75 (12,3%)	46 (7,6%)*
Sérový kreatinin [μmol/L]	77,0 (69,0-86,4)	75,0 (66,0-85,0)	-2,4 (-8,6-4,9)*
eGFR [mL/min]	84,8 (74,6-95,9)	83,9 (72,3-94,9)	-2,4 (-9,3-5,6)*
sRAGE [pg/mL]	1226 (943-1588)	992 (762-1338)	-216 (-463- -27)*
aPWV [m/sec]	7,50 (6,20-9,00)	8,55 (7,40-10,25)	1,23 (0,38-2,50)*

Hodnota p počítaná pomocí Wilcoxon sign-rank párového testu či McNemarova testu u kategoričkových proměnných, \* $p < 0,001$

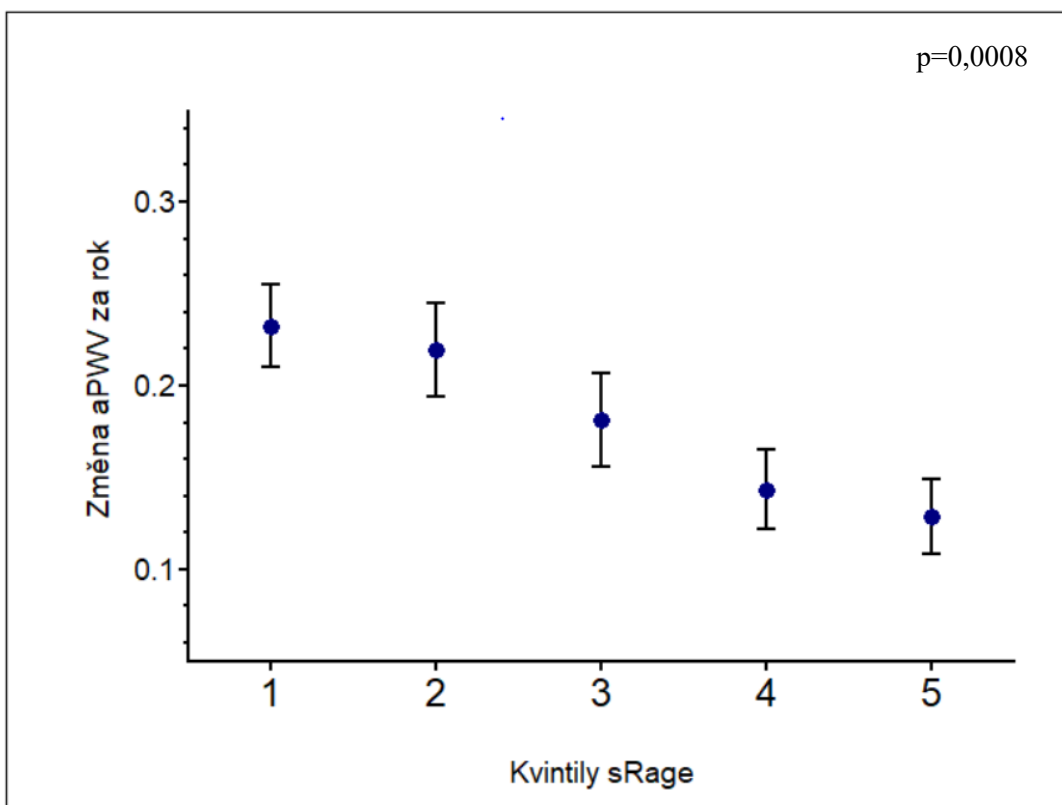
<sup>#</sup> anamnéza ICHS, ischemické CMP, nemoci periferních tepen či aterosklerózy jiné lokalizace včetně historie revaskularizace; <sup>§</sup> systolický TK  $\geq 140$  nebo diastolický TK  $\geq 90$  mmHg a/nebo užívání antihypertenzní medikace; <sup>+</sup> lačná glykémie  $\geq 7$  mmol/L nebo antidiabetická medikace

### 4.3 Solubilní receptor pro produkty pokročilé glykace jako nezávislý prediktor vzestupu rychlosti aortální pulzní vlny

Tato analýza probíhala na kohortě popsané výše. Pro neúplná či chybějící data proběhla finální analýza na 530 jedincích o průměrném věku při vstupním vyšetření 53,9 let, muži tvořili 45,1% analyzovaného vzorku (239 jedinců). Průměrný vzestup aPWV za rok byl 0,18m/s. Byla hledána asociace mezi koncentrací cirkulujících sRAGE v krvi měřených metodou ELISA a dynamikou cévního tuhnutí. Univariátní analýzou byla s sRAGE nalezena nejsilnější korelace s obvodem pasu (Spearmanův korelační koeficient  $r = -0,36$ ,  $p < 0,0001$ ), BMI ( $r = -0,333$   $< 0,0001$ ) a lačnou glykemií ( $r = -0,236$ ,  $p < 0,0001$ ). Semi-kvantitativní analýzou byla po rozdělení koncentrace sRAGE do kvintilů nalezena významná inverzní asociace s intraindividuálním vzestupem aPWV za rok – obrázek 8.

Sérií lineárních regresních modelů byla nalezena signifikantní asociace mezi  $\Delta$ PWV/rok a koncentrací sRAGE ( $p=0,003$ ), a to i po komplexní adjustaci na další rizikové faktory či farmakoterapii. Tato asociace zůstala významná i po vyřazení jedinců s jakoukoliv medikací, hypertenzí či anamnézou kardiovaskulárního onemocnění. Použitím step-wise logistických regresních modelů adjustovaných na další KV rizikové faktory a farmakoterapii bylo zjištěno, že nízká vstupní koncentrace sRAGE je významným prediktorem vzestupu aPWV o více než 0,2m/s za rok (OR=1.72, CI (1.06–2.79),  $p=0,028$ ) a naopak vysoká hladina byla protektivním faktorem. Tato asociace byla ještě významnější po vyřazení diabetiků a jedinců starších než 60 let z analýzy ( $p=0,003$ ).

Blíže jsou výsledky těchto analýz popsány v **příloze 2**.



**Obrázek 8** – Intraindividuální vzestup aPWV podle kvintilů sRAGE, p po adjustaci na věk, pohlaví a MAP, je ukázán průměr ± SEM  
Kvintily koncentrace sRAGE: I. <890, II. 890-1126, III. 1127-1400, IV. 1401-1694, V.  $\geq 1695$  pg/ml

#### 4.4 Parametry AGE-RAGE osy jako prediktory tuhnutí cévní stěny

Po potvrzení vlivu sRAGE na progresi tepenné tuhosti bylo následně zkoumání rozšířeno na další parametry AGE-RAGE osy. Do této analýzy bylo možno po kompletizaci dat zahrnout 536 jedinců o průměrném věku 53,8 let, muži tvořili 44,3% (237 jedinců) vzorku. Průměrný vzestup aPWV za rok byl v celé zahrnuté populaci 0,18 m/s. V rámci této analýzy byla hledána asociace mezi věkově podmíněným tuhnutím cévní stěny a pěti vybranými parametry AGE-RAGE osy, jmenovitě koncentrací CML, AGEs v kůži, koncentrací sRAGE a jejich poměr. V sérii lineárních regresních modelů s použitím intraindividuálního vzestup aPWV jako závislé proměnné byla nejsilnější asociace nalezena s AGEs v kůži ( $p=0,019$ ) a poměrem AGEs v kůži se sRAGE ( $p=0,018$ ), a to i po adjustaci na další KV rizikové faktory či farmakoterapii. Dále byla signifikantní asociace nalezena s koncentrací sRAGE ( $p=0,026$ ), naopak žádná asociace nebyla nalezena s koncentrací CML či poměrem CML a sRAGE. V dalším kroku byly použity logistické regresní modely adjustované na známé KV rizikové faktory a farmakoterapii. Nejsilnějším prediktorem akcelerovaného cévního tuhnutí, stanoveného jako  $\Delta\text{PWV}/\text{rok} \geq 0,2\text{m/s}$ , byl vysoký poměr AGEs v kůži a sRAGE ( $p=0,001$ ). Podobné výsledky byly nalezeny i po vyřazení diabetických jedinců z analýzy - tabulka 4.3. Dále je tato problematika prozkoumaná v **příloze 3**.

**Tabulka 4.3** - Plně adjustovaná asociace mezi akcelerovaným cévním tuhnutím a vybranými parametry AGE-sRAGE osy

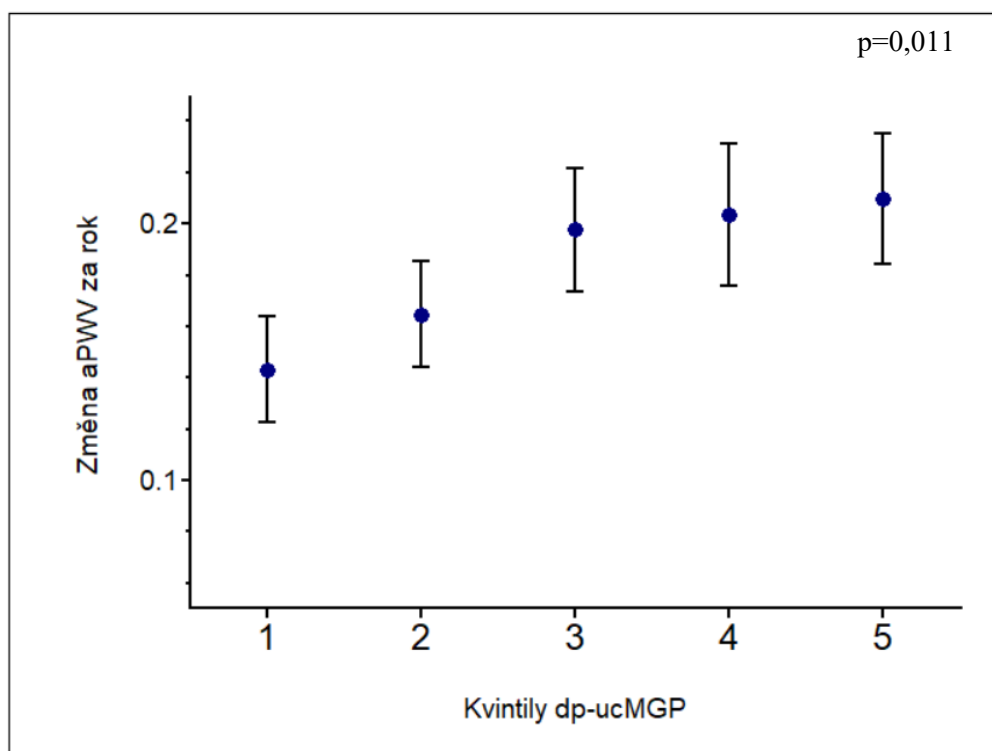
	Celý vzorek (n=536)		Nediabetici (n=479)	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
sRAGE <762 pg/mL	1,57 (1,03-2,38)	0,035	1,42 (0,91-2,22)	0,118
CML $\geq 278$ pg/mL	1,04 (0,68-1,59)	0,868	0,97 (0,61-1,55)	0,913
AGEs v kůži $\geq 2.8$	1,26 (0,81-1,98)	0,310	1,39 (0,85-2,27)	0,186
Poměr CML a sRAGE $\geq 309$	0,88 (0,58-1,35)	0,564	0,97 (0,81-1,16)	0,908
Poměr AGEs v kůži a sRAGE $\geq 3.3$	2,09 (1,35-3,22)	0,001	2,00 (1,26-3,19)	0,003

Výsledek multivariátní logistické regrese s použitím  $\Delta\text{PWV}/\text{rok} \geq 0.2$  m/s jako závislé proměnné. Každý z 5 parametrů byl testován v samostatném modelu, všechny modely byly adjustovány na: věk  $\geq 65$  let, pohlaví, anamnézu CVD, kouření, BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, hypertenze, LDL cholesterol  $\geq 2.5$  mmol/L, terapie statiny, manifestní DM (nepoužito při analýze nediabetických jedinců) a eGFR <60 mL/min

#### 4.5 Vliv hladiny vitamínu K na cévní stárnutí.

V této analýze jsme sledovali vztah mezi cévním tuhnutím a koncentrací dp-upMGP, který odráží hladinu vitamínu K, a to na identickém vzorku jako v části 4.2. Korelační analýzou byla nalezena významná korelace mezi  $\Delta$ PWV/rok a koncentrací dp-upMGP při vstupním vyšetření ( $R=0,128$ ,  $p=0,003$ ). Použitím lineárních step-wise regresních modelů byly nejvýznamnějšími prediktory vzestupu aPWV za rok věk a koncentrace sRAGE ( $p<0,0001$ ), dalším signifikantním prediktorem bylo pohlaví ( $p=0,004$ ) a koncentrace dp-ucMGP ( $p=0,016$ ). Při použití logistických regresních modelů byla nízká hladina dp-ucMGP významným prediktorem akcelerovaného cévního tuhnutí, definovaného jako  $\Delta$ PWV/rok  $\geq 0,2$ m/s, a to i po komplexní adjustaci na další KV rizikové faktory.

Blíže je tato problematika rozebrána v **příloze 4**.



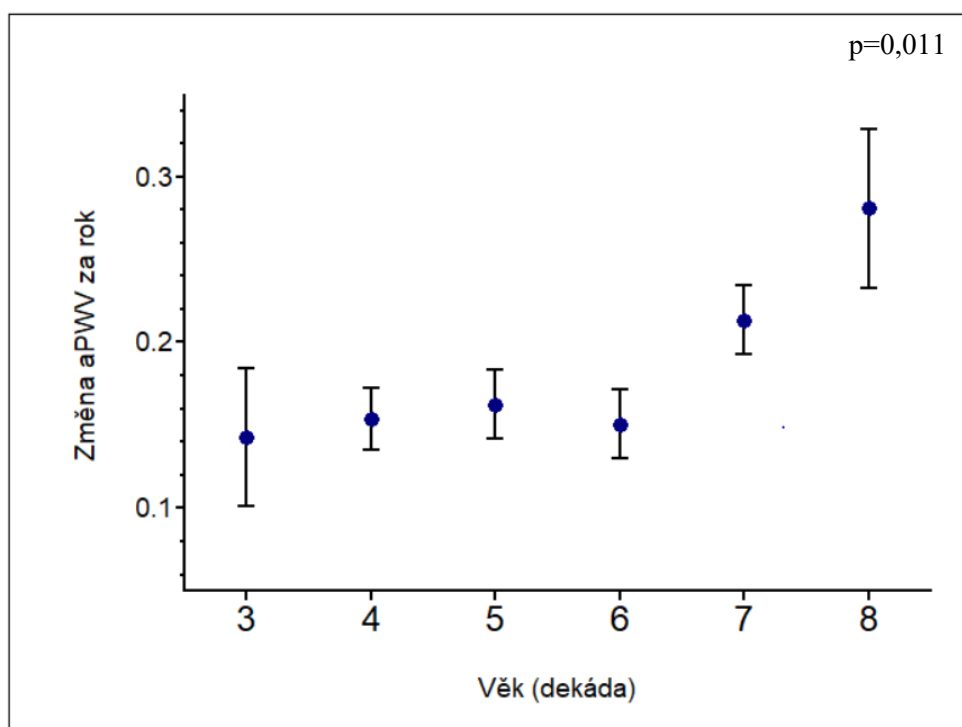
**Obrázek 9** – Intraindividuální vzestup aPWV podle kvintilů dp-ucMGP, p po adjustaci na věk, pohlaví, MAP, sRAGE a terapii antihypertenzívy či antidiabetiky. Je ukázán průměr  $\pm$  SEM. Kvintily koncentrace dp-ucMGP:  $\leq 356$ , 357-468, 469-568, 569-690 a  $\geq 691$  pmol/l

## 4.6 Další realizované sub-analýzy

### 4.6.1 Progrese cévní tuhosti podle konvenčních rizikových faktorů

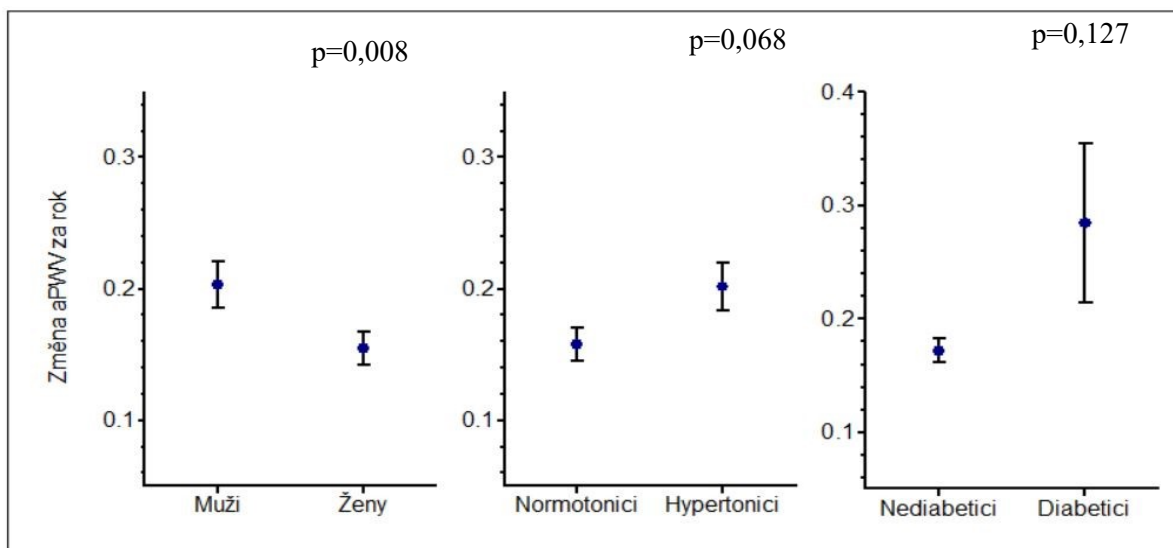
Během celého sledování (průměrně 8 let) byl průměrný nárůst aPWV v celém vzorku 0,18 m/s/rok. Proběhla i analýza nárůstu aPWV za rok po rozdělení celého vzorku do dekád. V první až páté dekádě byl průměrný nárůst aPWV za rok 0,15m/s, v šesté dekádě jsme již však pozorovali průměrný nárůst o 0,21m/s a v sedmé dokonce 0,28m/s. Použitím step-wise lineární regrese bylo zjištěno, že věková dekáda je signifikantním prediktorem vzestupu aPWV ( $\beta= 0,0228$  (SE 0,0090),  $p=0,011$ ). Tuhnutí cévní stěny je dynamický proces a ukazuje se, že s věkem akceleruje.

Dále jsme porovnávali použitím MWU testu, jestli existuje rozdíl v  $\Delta$ PWV/rok mezi jednotlivými známými kardiovaskulárními rizikovými faktory. Při porovnání průměrného vzestupu aPWV za rok u mužů a žen (0,20 versus 0,15m/s) byl nalezený statisticky významný rozdíl ( $p=0,0079$ ). Nalezený rozdíl mezi hypertoniky a normotoniky při vstupném vyšetření byl statisticky nevýznamný (0,16 versus 0,20m/s,  $p=0,068$ ). Výrazný rozdíl mezi diabetiky a nediabetiky byl statisticky nevýznamný (0,28 versus 0,17 m/s,  $p=0,127$ ), což by se dalo vysvětlit velice malým podílem diabetiků v celém studovaném vzorku.



Obrázek 10 – Intraindividuální vzestup aPWV podle věkových dekád, průměr ± SEM

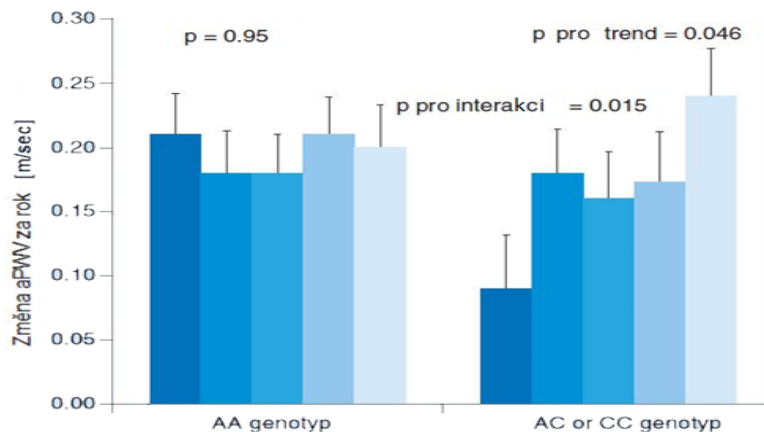




**Obrázek 11** – Intra individuální vzestup aPWV podle pohlaví, hypertenze a diabetu, je ukázán průměr ± SEM

#### 4.6.2 Vztah mezi sclerostinem a věkově podmíněným tuhnutím cévní stěny

V další sub-analýze jsme sledovali efekt vstupní hladiny sclerostinu, glykoproteinu důležitého při inhibici kalcifikace, na progresi cévního tuhnutí. Pomocí lineárních regresních modelů byla nalezena významná asociace mezi koncentrací sclerostinu a  $\Delta$ PWV/rok ( $\beta = 0.0002$ , SE 0.0001;  $p = 0.045$ ), ta však vymizela po adjustaci na věk. Všichni jedinci byly genotypizováni na polymorfismus genu pro angiotensin II receptor 1 (rs5186). Genotyp AA byl nalezen u 276, AC u 214 a CC u 32 jedinců, frekvence alely A byla 73,6% a alely C 26,4% s hodnotou  $p$  pro Hardyho–Weinbergův zákon rovnou 0,26. Po rozdělení celého vzorku do kvintilů podle koncentrace sklerostinu byla pozorována statisticky významná asociace mezi vzestupem aPWV a sklerostinem avšak pouze u nositelů alely C – obrázek 12. Výsledky byly publikovány (Mayer et al. 2020).



**Obrázek 12** – Individuální progresse aPWV podle kvintilů sclerostinu a polymorfismů angiotensin II receptoru 1; Upraveno podle Mayer et. al. 2020

### 4.6.3 Analýza vybraných genetických polymorfismů a jejich vztah k cévnímu tuhnutí

V rámci této analýzy byla hledána asociace mezi intraindividuálním vzestupem aPWV a vybranými devíti polymorfismy DNA mající potenciální vliv na strukturu či funkci cév. Na základě v minulosti publikovaných prací a předpokládaném patofyziologickém účinku byly vybrány polymorfismy genů kódujících: endotelovou NO-syntázu (SNP rs3918226, rs2070744, rs1799983), receptor pro vitamin D (SNP rs2228570), kolagen 1A1 (SNP rs1800012), kolagen 4A1 (SNP rs3742207), natriuretický peptid A (SNP rs5068), receptor pro angiotensin II typ 1 (SNP rs5186) a adducin 1 (SNP rs4961).

Do analýzy bylo zahrnuto celkově 540 jedinců s výjimkou genu pro natriuretický peptid A, kde byly k dispozici vzorky od 535 subjektů. Všichni jedinci byli stratifikováni podle přítomného genotypu. Pro každý polymorfismus byl pomocí logistických regresních modelů adjustovaných na další rizikové faktory porovnáván vliv nositelství mutantní alely jak v homozygotní, tak heterozygotní formě vůči tzv. divokému (wild type) genotypu na akcelerované tuhnutí cév. Výrazná asociace byla nalezena při nositelství mutantní alely pro gen kódující receptor pro vitamin D a dále pro homozygotní nositelství mutantní alely pro kolagen 4A1. Celkové výsledky této analýzy jsou uvedeny v **tabulce 4.4**.

**Tabulka 4.4** - Riziko akcelerovaného tuhnutí tepen v závislosti na přítomnost mutantní alely jak v homozygotním, tak heterozygotním stavu

Gen kódující (SNP):	Přítomnost mutace v homozygotním stavu		Přítomnost mutace (homozygoti i heterozygoti)	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
NO-syntázu (rs3918226)	0,91 (0,17-4,78)	0,934	0,73 (0,46-1,17)	0,192
NO-syntázu (rs2070744)	1,00 (0,59-1,71)	0,786	0,93 (0,57-1,52)	0,769
NO-syntázu (rs1799983)	0,73 (0,40-1,31)	0,288	0,92 (0,64-1,30)	0,621
Receptor vitaminu D (rs2228570)	0,52 (0,31-0,87)	<b>0,027</b>	0,68 (0,47-0,99)	<b>0,049</b>
Kolagen 1A1 (rs1800012)	0,72 (0,27-1,93)	0,330	1,29 (0,88-1,88)	0,187
Kolagen 4A1 (rs3742207)	0,47 (0,25-0,90)	<b>0,029</b>	0,78 (0,54-1,11)	0,164
Natriuretický peptid A (rs5068)	0,68 (0,15-3,01)	0,682	0,84 (0,48-1,45)	0,521
Receptor pro AT II (rs5186)	1,01 (0,47-2,15)	0,865	0,91 (0,64-1,30)	0,596
Adducin 1 (rs4961)	0,47 (0,14-1,59)	0,311	0,74 (0,51-1,09)	0,127

Výsledek multivariátní logistické regrese s použitím  $\Delta$ PWV/rok  $\geq$  0,2 m/s jako závislé proměnné. Každý SNP byl testován v samostatném modelu, všechny modely byly adjustovány na: věk  $\geq$  65 let, pohlaví, anamnézu CVD, hypertenzi, užívání antihypertenzní medikace, terapii statiny, manifestní DM, terapii antidiabetiky

## 5 Souhrnná diskuse

Tato práce se zabývala hledáním determinant tepenné tuhosti. V první publikaci jsme v rámci průřezové studie na obecné populaci prokázali významnou asociaci mezi tepennou tuhostí, kvantifikovanou jako aPWV, a parametry glukózového metabolismu, včetně AGE-RAGE osy. Nejsilnější asociace byla nalezena s hodnotou lačné glykémie, kožními AGEs měřenými auto fluorescenční metodou, hladinou sRAGE a poměrem kožních AGEs se sRAGE.

Všechny následné analýzy probíhaly na datech získaných během osmiletého sledování kohorty obecné populace. Závislým parametrem byla pokaždé průměrná změna aPWV za rok, reflektující progresi tuhnutí centrálních tepen. V druhé publikaci jsme prokázali, že hladina sRAGE významně ovlivnila rychlost změny aPWV během sledování. V prvním a pátém kvintilu dle sRAGE byl průměrný nárůst aPWV za rok 0,13 a 0,23m/s, což ukazuje téměř dvounásobnou rychlost progresu tepenné tuhosti u jedinců s nízkou hladinou sRAGE. Tato asociace mezi hladinou sRAGE a nárůstem aPWV byla ještě významnější u normotenzních jedinců bez manifestního DM mladších než 60 let v době prvního vyšetření. Ve třetí publikaci jsme bádání rozšířili o další parametry AGE-RAGE osy. Signifikantní prediktivní hodnota na nárůst aPWV byla nalezena u cirkulujících sRAGE a kožních AGEs. Klíčovým nálezem této publikace však bylo, že nejlepším prediktorem akcelerovaného tuhnutí tepen byl poměr mezi kožními AGEs se sRAGE. Tento parametr v sobě pojí jak rizikový biomarker - ve tkáních deponované AGEs, tak protektivní faktor - cirkulující sRAGE. V poslední publikaci jsme se zaměřili na další metabolický faktor nesouvisející s metabolismem glukózy, konkrétně hladinu dp-up MGP, který odpovídá tkáňové hladině vitamínu K. Prokázali jsme, že nízká hladina tohoto proteinu byla významným faktorem zpomalujícím progresi tepenného tuhnutí. Několik studií ukázalo, že užívání warfarinu výrazně akceleruje vaskulární kalcifikaci (Poterucha and Goldhaber 2016). Naše výsledky nasvědčují tomu, že by také mohl akcelarovat tepenné tuhnutí cestou interakce s vitamínem K a následnou zvýšenou kalcifikací z důvodu nedostatečné karboxylace MGP. Toto tvrzení koreluje s výsledkem studie, ve které bylo pozorováno signifikantní snížení aPWV u nemocných s fibrilací síní po převodu z warfarinu na rivaroxaban (Ikari et al. 2020). V posledním kroku jsme provedli analýzu celé kohorty a potvrdili výrazný rozdíl v tuhnutí tepen mezi hypertoniky a normotoniky. Dále jsme i na našem vzorku populace potvrdili, že tepenné tuhnutí akceleruje s narůstající

věkovou dekádou. Z pohledu genetických polymorfismů byla výrazná asociace s nárůstem aPWV nalezena pouze u polymorfismu genu kódujícího receptor pro vitamin D. To nasvědčuje tomu, že dosud publikované genotypové studie na aPWV jsou s největší pravděpodobností zatíženy falešnými pozitivitami. Vzniká tedy otázka, jestli má smysl hledat dědičný podklad pro tepennou tuhost, která je multifaktoriální, a jeden určující gen tudíž s velkou pravděpodobností nenalezneme.

## 5.1 Klinický význam měření tepenné tuhosti

Existuje velké množství metod určených k vyšetření tepenného systému, které se navzájem významně liší. Metody, které jsou neinvazivní, snadno proveditelné a dobře reprodukovatelné, jsou potenciálně použitelné v obecné populaci, nebo u velkých skupin nemocných. Má tedy smysl zjišťovat, zda mají prognostický význam a zda je lze eventuálně použít ke stratifikaci rizika nemocných. První přímé měření tepenné tuhosti pomocí rychlosti pulzní vlny provedli a publikovali ve dvacátých letech již Bramwell a Hill, přičemž popsali efekt věku a nemocí na tento parametr (Bramwell and Hill 1922). Neměřili však rychlost aortální, ale karotido-radiální pulzové vlny, která zohledňuje primárně tuhost muskulárních arterií paže. Během následujícího století došlo k významnému pokroku na poli měření a výzkumu tepenných vln. Tepenná tuhost centrálních tepen, měřená jako aPWV, se ukázala být významným prediktorem kardiovaskulárních příhod nezávislým na klasických KV rizikových faktorech. Tato prediktivní hodnota byla nejdříve prokázána ve vysoce rizikových skupinách, jako jsou nemocní s terminálním ledvinným selháním (Blacher et al. 1999), u diabetiků (Cruickshank et al. 2002), či u hypertoniků (Laurent et al. 2001). Následně však byla prokázána i na obecné, zdravé populaci (Ben-Shlomo et al. 2014; Mitchell et al. 2010). Po vyhodnocení kardiovaskulárních příhod u 1045 hypertoniků v průběhu šestiletého sledování bylo zjištěno, že stanovení rizika podle Framinghamského skóre založeného na klasických rizikových faktorech je u velké části hypertoniků nepřesné. Použití aPWV vedlo k podstatnému zpřesnění predikce rizika u nemocných, kteří byli původně označeni jako nízcí rizikové (Boutouyrie et al. 2002).

Měření tepenné tuhosti pomocí kvantifikace aPWV je neinvazivní, jednoduché a levné. Jak bylo popsáno v úvodu, hypertrofie tepenné stěny a rozšíření intimo-mediální vrstvy, čili změny spojené s tuhnutím tepen, předchází rozvoji aterosklerotických plátů

(Riggio et al. 2010). Měření tepenné tuhosti v klinické praxi by tedy mohlo pomoci identifikovat asymptomatické jedince, kteří jsou na základě klasických skórovacích metod zařazeni do pásma nízkého KV rizika, a kteří by mohli profitovat z brzkého zahájení antihypertenzní terapie. Měření tepenné tuhosti dává hypoteticky prostor k prevenci dříve, než dojde ke klinickému rozvoji aterosklerózy. K potvrzení této hypotézy však v současnosti chybí data z kvalitních randomizovaných kontrolovaných studií.

## **5.2 Současnost a budoucnost studování tepenné tuhosti**

Vzhledem ke klinické a patofyziologické významnosti tepenné tuhosti a jejímu těsnému propojení s poškozením cílových orgánů bylo intenzivně zkoumáno, zda lze tuhnutí tepen předcházet, nebo ho dokonce zvrátit. Studie provedené na různých populacích lovců a sběračů ukázaly, že PP či aPWV v těchto kohortách nenarůstají s věkem, což nasvědčuje tomu, že hladiny tepenné tuhosti měřené u mladých jedinců mohou za jistých okolností přetrvávat po celý život (Gurven et al. 2012; Lemogoum et al. 2012). Jak bylo popsáno v úvodu, tepenná tuhost je vysoce multifaktoriální a podílí se na ní množství faktorů. V porovnání například s měřením periferního TK je parametrem mnohem více stabilním. S výjimkou okamžité změny aPWV měřitelné po signifikantním snížení krevního tlaku jsou jiné intervence, které by měly zasahovat do materiální tuhosti samotných tepenných stěn, velice dlouhodobé. Může trvat několik měsíců až let, než se tyto intervence projeví měřitelným poklesem či zastavením růstu aPWV (Ait-Oufella et al. 2010). Tato skutečnost zvyšuje nároky na design studií zkoumajících tepennou tuhost, které by tudíž měly být ideálně longitudinální a randomizované.

Vzhledem k výše popsané multifaktoriálnosti, kde každý faktor má mírný, ale významný efekt na tepennou tuhost, současný výzkum je orientován na koncept vaskulárního věku. Tento koncept je postavený na zjištění, že někteří jedinci mají pokročilé abnormality ve vaskulární struktuře či funkci, které je predisponují k časným KV příhodám, zatímco jiní jedinci mají tuto vaskulární strukturu či funkci normální, či dokonce „supernormální“. Data z longitudinální Framinghamské studie ukázala, že pomalé vaskulární stárnutí asociované s významným snížením množství fatálních KV příhod je možné, ale současně je velice vzácné (Niiranen et al. 2017). Časné práce vyjadřovaly vaskulární věk a s ním spojené riziko pomocí Framinghamského rizikového skóre (D'Agostino et al. 2008), či v Evropě více užívaných SCORE tabulek (Cuende et al.

2010). Paralelně s tímto přístupem byl navrhnut koncept časného tepenného stárnutí - early vascular ageing (EVA), založeného na určení vaskulárního věku pomocí srovnání změřeného aPWV s odpovídající průměrnou hodnotou podle věku a TK v referenční populaci (Nilsson et al. 2008). Následně byla do tohoto konceptu zavzata i opačná možnost, kde měl daný jedinec „podprůměrnou“ aPWV, a tudíž byl jeho tepenný věk „supernormální“ - supernormal vascular age (SUPERNOVA). V recentní studii byl zohledněn kombinovaný přístup určení vaskulárního věku zohledňující rizikové faktory spolu s měřenou aPWV. Na vzorku o velikosti 3347 jedinců rozdělených do tří skupin na EVA, normální vaskulární věk a SUPERNOVA na základě kombinace těchto faktorů byla nalezena významně rozdílná incidence KV příhod mezi danými skupinami. V modelu, ve kterém byl vaskulární věk určen pouze na základě změřené aPWV, tento rozdíl nalezen nebyl (Bruno et al. 2020). Směrem, kterým by se měl další výzkum vydat, je identifikace rizikových či protektivních faktorů ovlivňujících vaskulární věk. Potenciální využití měření tepenné tuhosti v klinické praxi do budoucnosti je:

1. Stratifikace a zpřesnění KV rizika, dominantně u mladších hraničních jedinců.
2. Lepší definování hranic pro zahájení antihypertenzní medikace. Tento přístup se nabízí vzhledem k obousměrnému kauzálnímu vztahu mezi tepennou tuhostí a arteriální hypertenzí. Benefit použití měření aPWV při zahájení antihypertenzní terapie však dosud v randomizované studii testován nebyl.
3. Výběr antihypertenzní medikace. Jak bylo popsáno v úvodu, různé antihypertenzíva ovlivňují tepennou tuhost různě. Vzhledem k silnější asociaci mezi KV mortalitou a aPWV než měřeným periferním TK by použití aPWV místo TK při titraci antihypertenzní medikace mohlo být efektivnější. Tento koncept je v současnosti testován ve studii SPARTE (Laurent et al. 2020).

Měření tepenné tuhosti čeká před plným využitím v klinické praxi ještě několik výzev. Samotné vyšetření trvá přibližně 20 minut. Tato doba se bude muset pro plné využití v praxi zkrátit, aby mohlo měření proběhnout během rutinní návštěvy ambulance. O toto se pokouší nové metody měření aPWV, například nepřímé metody založené na estimaci použitím brachiální manžety. V současnosti se však pořád jedná o nepřesné a ne plně validované měření. Dalším potenciálním problémem do budoucnosti je absence referenčních hodnot použitelných v různorodých populacích - v současnosti dostupné referenční hodnoty jsou založené primárně na evropském obyvatelstvu bílé rasy (Banegas and Townsend 2020). Z pohledu ovlivnění progresu tuhosti centrálních tepen také zůstává

otevřená otázka cílů pro intervenci a hledání či potvrzení známých či potenciálních rizikových a protektivních faktorů, ideálně v kontextu longitudinální studie, což bylo primárně i cílem této disertační práce.

### **5.3 Osa AGE-RAGE v kontextu tepenné tuhosti**

Naše výsledky ukazují, že různé parametry AGE-RAGE osy mají různý efekt na tepennou tuhost a tepenné tuhnutí. Prokázali jsme protektivní vliv sRAGE, nežádoucí vliv AGEs deponovaných v kůži a v neposlední řadě i efekt použití kombinace těchto dvou faktorů. Nenalezli jsme žádnou asociaci mezi CML a aPWV či její změnou za rok. I když je CML jedním z nejvíce používaných představitelů cirkulujících AGEs, v kontextu tepenné tuhosti pravděpodobně není nejlepším ukazatelem. Patří do skupiny AGEs netvořících příčné spojky mezi proteiny, protože má pouze jedno vazebné místo. Naopak pentosidin, jeden z AGEs měřených autoflorescenční metodou, tyto spojky vytváří. V minulosti publikovaná studie našla asociaci mezi aPWV a CML u hypertenzních jedinců (McNulty et al. 2007). Můžeme pouze spekulovat, zda tato diskrepance odráží nižší senzitivitu CML v kontextu relativně zdravé populace, anebo je hypertenze stavem, při kterém se tvoří obecně více AGEs, včetně CML. Při vedlejší analýze jsme však v našem vzorku nenalezli ani žádnou asociaci mezi CML a AGEs měřenými v kůži. Každopádně se složky osy AGE-RAGE zdají být slibným biomarkerem při stratifikaci rizika či intervenci do budoucna v kontextu nejen tepenného stárnutí, i když, jak bylo popsáno v části 1.7.6, dosud testované léky nenaplnily očekávání.

### **5.4 Limitace**

Naše vybrané kohorty byly založeny na vzorku obecné populace. Účast ve studiích je vysoce závislá na ochotě účastnit se. Naše výsledky mohou být zkresleny faktem, že obecně zdravější jedinci jsou ochotnější zúčastňovat se různých šetření. Naše výsledky tudíž nemohou být plně zobecněny, zvláště u více vaskulárně kompromitovaných jedinců. Naše výsledky vycházejí z jednoho měření parametrů osy AGE-RAGE, některé z těchto parametrů se však mohou výrazně měnit v čase v reakci například na stresovou situaci.



## 6 Závěry

Stárnutí tepenného systému vede k ateroskleróze a tuhnutí tepenné stěny. Tyto patologie spolu mohou koexistovat a interferovat, liší se však svojí lokalitou, patogenezí, rozsahem a konsekvencemi. Tuhnutí centrálních tepen je kromě jiného zodpovědné za řadu věkově podmíněných projevů, jako je vzestup centrálního systolického tlaku, či vznik izolované systolické hypertenze ve stáří, což přímo poškozuje srdce, mozek a ledviny. Klinicky se tepenná tuhost manifestuje jako rychlost šíření aortální pulzové vlny. Rychlost aortální pulzové vlny je jedním z nejlepších nezávislých prediktorů kardiovaskulární mortality a morbidity, přinejmenším u jedinců, kteří nemají rozvinutou pokročilou aterosklerózu. Tuhnutí tepen je velice multifaktoriální, přičemž primárním mechanismem v jeho progresi je mechanické opotřebování elastinových vláken. Tato progresie může být akcelerována nebo zpomalena řadou známých i dosud pravděpodobně neznámých mechanismů. Studium tepenné tuhosti na různých populacích ukázalo, že její dynamika může být zpomalena, zastavena, či dokonce zvrácena. Vzhledem k výrazné asociaci aPWV s KV mortalitou má význam hledat faktory, které se na ní podílejí, ideálně v randomizovaném kontrolovaném designu pro určení potentních cílů intervence do budoucnosti. Z pohledu nastolené problematiky z našich výsledků vyplývá, že:

- Parametry osy AGE-RAGE se signifikantně podílejí na dynamice tepenného stárnutí, přičemž cirkulující sRAGE mají protektivní roli a deponované AGEs naopak tuhnutí tepen urychlují.
- Vitamin K má z pohledu tuhnutí tepen protektivní roli.
- Při hledání dědičného podkladu pro tepennou tuhost se velice pravděpodobně jeden určující gen nenalezne, jelikož se jedná o multifaktoriální a polygenní záležitost.

Potenciální klinické využití stanovení tepenné tuhosti je při stratifikaci KV rizika a identifikaci jedinců, kteří by mohli profitovat z časného zahájení antihypertenzní terapie, a to i přesto, že se na základě klasických KV rizikových faktorů pohybují v pásmu nízkého rizika. Dále by měření aPWV mohlo sloužit jako primární léčebný cíl při titraci antihypertenzní medikace.

## 7 Seznam použité literatury (celkem použito 110 zdrojů)

- AHMED, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*, Jan 2005, 67(1), 3-21.
- AIT-OUFELLA, H., C. COLLIN, E. BOZEC, B. LALOUX, et al. Long-term reduction in aortic stiffness: a 5.3-year follow-up in routine clinical practice. *J Hypertens*, Nov 2010, 28(11), 2336-2341.
- ARRIBAS, S. M., A. HINEK AND M. C. GONZÁLEZ Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther*, Sep 2006, 111(3), 771-791.
- ASMAR, R., M. F. O'ROURKE AND M. SAFAR *Arterial stiffness and pulse wave velocity clinical applications*. Edition ed. Paris: Elsevier, 1999. ISBN 2-84299-148-6.
- AVOLIO, A. P., F. Q. DENG, W. Q. LI, Y. F. LUO, et al. Effects of aging on arterial distensibility in populations with high and low prevalence of hypertension: comparison between urban and rural communities in China. *Circulation*, Feb 1985, 71(2), 202-210.
- BANEGAS, J. R. AND R. R. TOWNSEND Arterial stiffness and reference values. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, Jan 2020, 73(1), 11-13.
- BARRETT, E. J., Z. LIU, M. KHAMAISI, G. L. KING, et al. Diabetic Microvascular Disease: An Endocrine Society Scientific Statement. *J Clin Endocrinol Metab*, Dec 1 2017, 102(12), 4343-4410.
- BATZIAS, K., A. S. ANTONOPOULOS, E. OIKONOMOU, G. SIASOS, et al. Effects of Newer Antidiabetic Drugs on Endothelial Function and Arterial Stiffness: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Diabetes Res*, 2018, 2018, 1232583.
- BELL, V., E. L. MCCABE, M. G. LARSON, J. RONG, et al. Relations Between Aortic Stiffness and Left Ventricular Mechanical Function in the Community. *J Am Heart Assoc*, Jan 9 2017, 6(1).
- BELL, V., S. SIGURDSSON, J. J. WESTENBERG, J. D. GOTAL, et al. Relations between aortic stiffness and left ventricular structure and function in older participants in the Age, Gene/Environment Susceptibility--Reykjavik Study. *Circ Cardiovasc Imaging*, Apr 2015, 8(4), e003039.
- BEN-SHLOMO, Y., M. SPEARS, C. BOUSTRED, M. MAY, et al. Aortic pulse wave velocity improves cardiovascular event prediction: an individual participant meta-analysis of prospective observational data from 17,635 subjects. *J Am Coll Cardiol*, Feb 25 2014, 63(7), 636-646.
- BENETOS, A., S. GAUTIER, S. RICARD, J. TOPOUCHIAN, et al. Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation*, Aug 15 1996, 94(4), 698-703.
- BLACHER, J., A. P. GUERIN, B. PANNIER, S. J. MARCHAIS, et al. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation*, May 11 1999, 99(18), 2434-2439.
- BOUTOUYRIE, P., P. CHOWIENCZYK, J. D. HUMPHREY AND G. F. MITCHELL Arterial Stiffness and Cardiovascular Risk in Hypertension. *Circ Res*, Apr 2 2021, 128(7), 864-886.
- BOUTOUYRIE, P., A. I. TROPEANO, R. ASMAR, I. GAUTIER, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. *Hypertension*, Jan 2002, 39(1), 10-15.
- BRAMWELL, J. C. AND A. V. HILL Velocity of transmission of the pulse-wave. *The Lancet*, 1922, 199, 891-892.

BRUNO, R. M., P. M. NILSSON, G. ENGSTRÖM, B. N. WADSTRÖM, et al. Early and Supernormal Vascular Aging: Clinical Characteristics and Association With Incident Cardiovascular Events. *Hypertension*, Nov 2020, 76(5), 1616-1624.

CAFFARELLI, C., A. MONTAGNANI, R. NUTI AND S. GONNELLI Bisphosphonates, atherosclerosis and vascular calcification: update and systematic review of clinical studies. *Clin Interv Aging*, 2017, 12, 1819-1828.

CECELJA, M. AND P. CHOWIENCZYK Dissociation of aortic pulse wave velocity with risk factors for cardiovascular disease other than hypertension: a systematic review. *Hypertension*, Dec 2009, 54(6), 1328-1336.

CHEN, C. H., E. NEVO, B. FETICS, P. H. PAK, et al. Estimation of central aortic pressure waveform by mathematical transformation of radial tonometry pressure. Validation of generalized transfer function. *Circulation*, Apr 1 1997, 95(7), 1827-1836.

CHILTON, R., I. TIKKANEN, C. P. CANNON, S. CROWE, et al. Effects of empagliflozin on blood pressure and markers of arterial stiffness and vascular resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, Dec 2015, 17(12), 1180-1193.

CLIMIE, R. E. D., D. S. PICONE, S. BLACKWOOD, S. E. KEEL, et al. Pulsatile interaction between the macro-vasculature and micro-vasculature: proof-of-concept among patients with type 2 diabetes. *Eur J Appl Physiol*, Nov 2018, 118(11), 2455-2463.

COLLABORATION, T. R. V. F. A. S. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *European Heart Journal*, 2010, 31(19), 2338-2350.

COSTANZO, P., P. PERRONE-FILARDI, E. VASSALLO, S. PAOLILLO, et al. Does carotid intima-media thickness regression predict reduction of cardiovascular events? A meta-analysis of 41 randomized trials. *J Am Coll Cardiol*, Dec 7 2010, 56(24), 2006-2020.

CRUICKSHANK, K., L. RISTE, S. G. ANDERSON, J. S. WRIGHT, et al. Aortic pulse-wave velocity and its relationship to mortality in diabetes and glucose intolerance: an integrated index of vascular function? *Circulation*, Oct 15 2002, 106(16), 2085-2090.

CUENDE, J. I., N. CUENDE AND J. CALAVERAS-LAGARTOS How to calculate vascular age with the SCORE project scales: a new method of cardiovascular risk evaluation. *Eur Heart J*, Oct 2010, 31(19), 2351-2358.

CÍFKOVÁ, R., J. BRUTHANS, V. ADÁMKOVÁ, M. JOZÍFOVÁ, et al. Prevalence základních kardiovaskulárních rizikových faktorů v české populaci v letech 2006-2009. Studie Czech post-MONICA. *Cor et Vasa*, 2011, 53(4), 220-229.

ČIHÁK, R., R. DRUGA, M. GRIM, M. MED, et al. *Anatomie 3*. Edition ed. Praha: Grada Publishing, 2001. 692 p. ISBN 978-80-247-1132-4.

D'AGOSTINO, R. B., SR., R. S. VASAN, M. J. PENCINA, P. A. WOLF, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*, Feb 12 2008, 117(6), 743-753.

D'ELIA, L., F. GALLETI, E. LA FATA, P. SABINO, et al. Effect of dietary sodium restriction on arterial stiffness: systematic review and meta-analysis of the randomized controlled trials. *J Hypertens*, Apr 2018, 36(4), 734-743.

DAHLÖF, B., P. S. SEVER, N. R. POULTER, H. WEDEL, et al. Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*, Sep 10-16 2005, 366(9489), 895-906.

DALMEIJER, G. W., Y. T. VAN DER SCHOUW, C. VERMEER, E. J. MAGDELEYNS, et al. Circulating matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification and vitamin K status in healthy women. *J Nutr Biochem*, Apr 2013, 24(4), 624-628.

DANGARDT, F., M. CHARAKIDA, G. GEORGIPOULOS, S. T. CHIESA, et al. Association between fat mass through adolescence and arterial stiffness: a population-based study from The Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Lancet Child Adolesc Health*, Jul 2019, 3(7), 474-481.

DIMITRIADIS, K., C. TSIOUFIS, A. KASIAKOGIAS, A. MILIOU, et al. Soluble receptor for advanced glycation end-product levels are related to albuminuria and arterial stiffness in essential hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, Apr 2013, 23(4), 382-388.

ENGELN, L., C. D. STEHOUWER AND C. G. SCHALKWIJK Current therapeutic interventions in the glycation pathway: evidence from clinical studies. *Diabetes Obes Metab*, Aug 2013, 15(8), 677-689.

FACONTI, L., B. FARUKH, R. MCNALLY, A. WEBB, et al. Arterial Stiffness Can Be Modulated by Pressure-Independent Mechanisms in Hypertension. *J Am Heart Assoc*, Aug 6 2019, 8(15), e012601.

FERRANNINI, G., D. DE BACQUER, G. DE BACKER, K. KOTSEVA, et al. Screening for Glucose Perturbations and Risk Factor Management in Dysglycemic Patients With Coronary Artery Disease-A Persistent Challenge in Need of Substantial Improvement: A Report From ESC EORP EUROASPIRE V. *Diabetes Care*, Apr 2020, 43(4), 726-733.

FILIPOVSKÝ, J. Tepenný systém při hypertenzi. In J. WIDIMSKÝ ed. *Hypertenze*. Praha: Maxdorf, 2019, vol. 5, p. 120-137.

GERACI, G., G. MULÈ, G. COSTANZA, M. MOGAVERO, et al. Relationship Between Carotid Atherosclerosis and Pulse Pressure with Renal Hemodynamics in Hypertensive Patients. *Am J Hypertens*, Apr 2016, 29(4), 519-527.

GOLDIN, A., J. A. BECKMAN, A. M. SCHMIDT AND M. A. CREAGER Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*, Aug 8 2006, 114(6), 597-605.

GUERIN, A. P., J. BLACHER, B. PANNIER, S. J. MARCHAIS, et al. Impact of aortic stiffness attenuation on survival of patients in end-stage renal failure. *Circulation*, Feb 20 2001, 103(7), 987-992.

GUO, J., A. FUJIYOSHI, B. WILLCOX, J. CHOO, et al. Increased Aortic Calcification Is Associated With Arterial Stiffness Progression in Multiethnic Middle-Aged Men. *Hypertension*, Jan 2017, 69(1), 102-108.

GURVEN, M., A. D. BLACKWELL, D. E. RODRÍGUEZ, J. STIEGLITZ, et al. Does blood pressure inevitably rise with age?: longitudinal evidence among forager-horticulturalists. *Hypertension*, Jul 2012, 60(1), 25-33.

HERBERT, A., J. K. CRUICKSHANK, S. LAURENT AND P. BOUTOUYRIE Establishing reference values for central blood pressure and its amplification in a general healthy population and according to cardiovascular risk factors. *Eur Heart J*, Nov 21 2014, 35(44), 3122-3133.

HUGHES, T. M., L. H. KULLER, E. J. BARINAS-MITCHELL, R. H. MACKEY, et al. Pulse wave velocity is associated with  $\beta$ -amyloid deposition in the brains of very elderly adults. *Neurology*, Nov 5 2013, 81(19), 1711-1718.

HUMPHREY, J. D., D. G. HARRISON, C. A. FIGUEROA, P. LACOLLEY, et al. Central Artery Stiffness in Hypertension and Aging: A Problem With Cause and Consequence. *Circ Res*, Feb 5 2016, 118(3), 379-381.

IKARI, Y., F. SAITO, T. KIYOOKA, M. NAGAOKA, et al. Switching from Warfarin to rivaroxaban induces sufficiency of vitamin K and reduction of arterial stiffness in patients with atrial fibrillation. *Heart Vessels*, Dec 2020, 35(12), 1727-1733.

JOHANSEN, N. B., D. VISTISEN, E. J. BRUNNER, A. G. TABÁK, et al. Determinants of aortic stiffness: 16-year follow-up of the Whitehall II study. *PLoS One*, 2012, 7(5), e37165.

JOLLY, T. A., G. A. BATEMAN, C. R. LEVI, M. W. PARSONS, et al. Early detection of microstructural white matter changes associated with arterial pulsatility. *Front Hum Neurosci*, 2013, 7, 782.

JUNQUEIRA, L. C., R. O. KELLEY, R. JELÍNEK AND J. CARNEIRO *Základy histologie*. Edtion ed. Jinocany: H & H, 1997. ISBN 8085787377 9788085787375.

KAESS, B. M., J. RONG, M. G. LARSON, N. M. HAMBURG, et al. Relations of Central Hemodynamics and Aortic Stiffness with Left Ventricular Structure and Function: The Framingham Heart Study. *J Am Heart Assoc*, Mar 25 2016, 5(3), e002693.

KAESS, B. M., J. RONG, M. G. LARSON, N. M. HAMBURG, et al. Aortic stiffness, blood pressure progression, and incident hypertension. *Jama*, Sep 5 2012, 308(9), 875-881.

KALOUSOVA, M., T. ZIMA, V. TESAR, S. DUSILOVA-SULKOVA, et al. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. *Mutat Res*, Nov 11 2005, 579(1-2), 37-46.

KOYAMA, H., H. YAMAMOTO AND Y. NISHIZAWA RAGE and soluble RAGE: potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Mol Med*, Nov-Dec 2007, 13(11-12), 625-635.

KUČEROVÁ-SEIDLEROVÁ, J., J. FILIPOVSKÝ, J. A. STAESSEN, M. CWYNAR, et al. Arterial characteristics in normotensive offspring of parents with or without a history of hypertension. *Am J Hypertens*, Mar 2006, 19(3), 264-269.

LAURENT, S. AND E. AGABITI-ROSEI. The Cross-talk between the macro and the microcirculation. In P.M. NILSSON ed. *Early Vascular Aging (EVA) : New Directions in Cardiovascular Protection*. 2015, p. 105-116.

LAURENT, S. AND P. BOUTOUYRIE The structural factor of hypertension: large and small artery alterations. *Circ Res*, Mar 13 2015, 116(6), 1007-1021.

LAURENT, S., P. BOUTOUYRIE, R. ASMAR, I. GAUTIER, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension*, May 2001, 37(5), 1236-1241.

LAURENT, S., J. COCKCROFT, L. VAN BORTEL, P. BOUTOUYRIE, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*, Nov 2006, 27(21), 2588-2605.

LEHMANN, E. D., G. F. WATTS, B. FATEMI-LANGROUDI AND R. G. GOSLING Aortic compliance in young patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)*, Dec 1992, 83(6), 717-721.

LEMOGOU, D., W. NGATCHOU, C. JANSSEN, M. LEEMAN, et al. Effects of hunter-gatherer subsistence mode on arterial distensibility in Cameroonian pygmies. *Hypertension*, Jul 2012, 60(1), 123-128.

LITTLE, W. C., M. R. ZILE, D. W. KITZMAN, W. G. HUNDLEY, et al. The effect of alagebrium chloride (ALT-711), a novel glucose cross-link breaker, in the treatment of elderly patients with diastolic heart failure. *J Card Fail*, Apr 2005, 11(3), 191-195.

LOUTZENHISER, R., A. BIDANI AND L. CHILTON Renal myogenic response: kinetic attributes and physiological role. *Circ Res*, Jun 28 2002, 90(12), 1316-1324.

MAC-WAY, F., A. POULIN, M. S. UTESCU, S. A. DE SERRES, et al. The impact of warfarin on the rate of progression of aortic stiffness in hemodialysis patients: a longitudinal study. *Nephrol Dial Transplant*, Nov 2014, 29(11), 2113-2120.

MAYER, O., JR., J. FILIPOVSKÝ, M. PESTA, R. CÍFKOVÁ, et al. The interaction of endothelial nitric oxide synthase polymorphism and current smoking in terms of increased arterial stiffness. *Physiol Res*, 2010, 59(4), 529-536.

MAYER, O., JR., J. FILIPOVSKÝ, J. SEIDLEROVÁ, J. VANĚK, et al. The association between low 25-hydroxyvitamin D and increased aortic stiffness. *J Hum Hypertens*, Nov 2012, 26(11), 650-655.

MAYER, O., JR., J. SEIDLEROVÁ, R. KUČERA, A. KUČEROVÁ, et al. Synergistic effect of sclerostin and angiotensin II receptor 1 polymorphism on arterial stiffening. *Biomark Med*, Feb 2020, 14(3), 173-184.

MAYER, O., JR., J. SEIDLEROVÁ, P. WOHLFAHRT, J. FILIPOVSKÝ, et al. Synergistic effect of low K and D vitamin status on arterial stiffness in a general population. *J Nutr Biochem*, Aug 2017, 46, 83-89.

MAYER, O., JR., J. SEIDLEROVÁ, P. WOHLFAHRT, J. FILIPOVSKÝ, et al. Desphospho-uncarboxylated matrix Gla protein is associated with increased aortic stiffness in a general population. *J Hum Hypertens*, Jul 2016a, 30(7), 418-423.

MAYER, O., J. SEIDLEROVA, J. FILIPOVSKY, P. VAGOVIKOVA, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products and increased aortic stiffness in the general population. *Hypertens Res*, Apr 2016b, 39(4), 266-271.

MCNULTY, M., A. MAHMUD AND J. FEELY Advanced glycation end-products and arterial stiffness in hypertension. *Am J Hypertens*, Mar 2007, 20(3), 242-247.

MITCHELL, G. F., A. L. DESTEFANO, M. G. LARSON, E. J. BENJAMIN, et al. Heritability and a genome-wide linkage scan for arterial stiffness, wave reflection, and mean arterial pressure: the Framingham Heart Study. *Circulation*, Jul 12 2005, 112(2), 194-199.

MITCHELL, G. F., S. J. HWANG, R. S. VASAN, M. G. LARSON, et al. Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study. *Circulation*, Feb 2 2010, 121(4), 505-511.

MITCHELL, G. F., R. S. VASAN, M. J. KEYES, H. PARISE, et al. Pulse pressure and risk of new-onset atrial fibrillation. *Jama*, Feb 21 2007, 297(7), 709-715.

MITCHELL, J. R. AND J. H. ADAMS Aortic size and aortic calcification. A necropsy Study. *Atherosclerosis*, Aug 1977, 27(4), 437-446.

MORGAN, T., J. LAURI, D. BERTRAM AND A. ANDERSON Effect of different antihypertensive drug classes on central aortic pressure. *Am J Hypertens*, Feb 2004, 17(2), 118-123.

NAJJAR, S. S., A. SCUTERI, V. SHETTY, J. G. WRIGHT, et al. Pulse wave velocity is an independent predictor of the longitudinal increase in systolic blood pressure and of incident hypertension in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Am Coll Cardiol*, Apr 8 2008, 51(14), 1377-1383.

NICHOLS, W. W. AND M. F. O'ROURKE *McDonald's blood flow in arteries : theoretical, experimental and clinical principles*. Edtion ed. London: Arnold, 1998. ISBN 0340646144 9780340646144.

NIIRANEN, T. J., A. LYASS, M. G. LARSON, N. M. HAMBURG, et al. Prevalence, Correlates, and Prognosis of Healthy Vascular Aging in a Western Community-Dwelling Cohort: The Framingham Heart Study. *Hypertension*, Aug 2017, 70(2), 267-274.

NILSSON, P. M., E. LURBE AND S. LAURENT The early life origins of vascular ageing and cardiovascular risk: the EVA syndrome. *J Hypertens*, Jun 2008, 26(6), 1049-1057.

ONG, K. T., S. DELERME, B. PANNIER, M. E. SAFAR, et al. Aortic stiffness is reduced beyond blood pressure lowering by short-term and long-term antihypertensive treatment: a meta-analysis of individual data in 294 patients. *J Hypertens*, Jun 2011, 29(6), 1034-1042.

OUDEGEEST-SANDER, M. H., M. G. OLDE RIKKERT, P. SMITS, D. H. THIJSEN, et al. The effect of an advanced glycation end-product crosslink breaker and exercise training on vascular function in older individuals: a randomized factorial design trial. *Exp Gerontol*, Dec 2013, 48(12), 1509-1517.

PARK, L., K. G. RAMAN, K. J. LEE, Y. LU, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nature Medicine*, 09/01/online 1998, 4, 1025.

PARRAGH, S., B. HAMETNER, M. BACHLER, T. WEBER, et al. Non-invasive wave reflection quantification in patients with reduced ejection fraction. *Physiol Meas*, Feb 2015, 36(2), 179-190.

PETERSEN, K. S., N. BLANCH, J. B. KEOGH AND P. M. CLIFTON Effect of weight loss on pulse wave velocity: systematic review and meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Jan 2015, 35(1), 243-252.

PIEPOLI, M. F., A. W. HOES, S. AGEWALL, C. ALBUS, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts): Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur J Prev Cardiol*, Jul 2016, 23(11), Np1-np96.

POTERUCHA, T. J. AND S. Z. GOLDHABER Warfarin and Vascular Calcification. *Am J Med*, Jun 2016, 129(6), 635.e631-634.

PRENNER, S. B. AND J. A. CHIRINOS Arterial stiffness in diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, Feb 2015, 238(2), 370-379.

RIGGIO, S., G. MANDRAFFINO, M. A. SARDO, R. IUDICELLO, et al. Pulse wave velocity and augmentation index, but not intima-media thickness, are early indicators of vascular damage in hypercholesterolemic children. *Eur J Clin Invest*, Mar 2010, 40(3), 250-257.

SALAHUDDIN, P., G. RABBANI AND R. H. KHAN The role of advanced glycation end products in various types of neurodegenerative disease: a therapeutic approach. *Cell Mol Biol Lett*, Sep 2014, 19(3), 407-437.

SEIDLEROVÁ, J., J. A. STAESSEN, M. BOCHUD, T. NAWROT, et al. Arterial properties in relation to genetic variations in the adducin subunits in a white population. *Am J Hypertens*, Jan 2009, 22(1), 21-26.

SEMBA, R. D., S. S. NAJJAR, K. SUN, E. G. LAKATTA, et al. Serum carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, is associated with increased aortic pulse wave velocity in adults. *Am J Hypertens*, Jan 2009, 22(1), 74-79.

SHANAHAN, C. M., D. PROUDFOOT, A. FARZANEH-FAR AND P. L. WEISSBERG The role of Gla proteins in vascular calcification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 1998, 8(3-4), 357-375.

SINGHAL, A., I. S. FAROOQI, T. J. COLE, S. O'RAHILLY, et al. Influence of leptin on arterial distensibility: a novel link between obesity and cardiovascular disease? *Circulation*, Oct 8 2002, 106(15), 1919-1924.

LAURENT, S., CHATELLIER, G., AZIZI, M., CALVET D., et al. Protocol of the SPARTE Study: A Strategy for Preventing Cardiovascular and Renal Events based on ARTERial Stiffness. *Artery Research*, 2020/07 2020, 26(4), 250-260.

SUGAWARA, J., K. HAYASHI, T. YOKOI AND H. TANAKA Age-associated elongation of the ascending aorta in adults. *JACC Cardiovasc Imaging*, Nov 2008, 1(6), 739-748.



TOWNSEND, R. R., I. B. WILKINSON, E. L. SCHIFFRIN, A. P. AVOLIO, et al. Recommendations for Improving and Standardizing Vascular Research on Arterial Stiffness: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension*, Sep 2015, 66(3), 698-722.

TSAO, C. W., K. M. PENCINA, J. M. MASSARO, E. J. BENJAMIN, et al. Cross-sectional relations of arterial stiffness, pressure pulsatility, wave reflection, and arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Nov 2014, 34(11), 2495-2500.

TUNSTALL-PEDOE, H., K. KUULASMAA, M. MÄHÖNEN, H. TOLONEN, et al. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*, May 8 1999, 353(9164), 1547-1557.

VAN BORTEL, L. M., S. LAURENT, P. BOUTOUYRIE, P. CHOWIENCZYK, et al. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens*, Mar 2012, 30(3), 445-448.

VIKNER, T., L. NYBERG, M. HOLMGREN, J. MALM, et al. Characterizing pulsatility in distal cerebral arteries using 4D flow MRI. *J Cereb Blood Flow Metab*, Dec 2020, 40(12), 2429-2440.

VLACHOPOULOS, C., K. AZNAOURIDIS, M. F. O'ROURKE, M. E. SAFAR, et al. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with central haemodynamics: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J*, Aug 2010, 31(15), 1865-1871.

VÁGOVIČOVÁ, P., J. MLÍKOVÁ SEIDLEROVÁ, O. MAYER, JR., P. WOHLFAHRT, et al. Differential effect of metabolic syndrome on various parameters of arterial stiffness. *Blood Press*, 2015, 24(4), 206-211.

WAY, K. L., R. N. SULTANA, A. SABAG, M. K. BAKER, et al. The effect of high Intensity interval training versus moderate intensity continuous training on arterial stiffness and 24h blood pressure responses: A systematic review and meta-analysis. *J Sci Med Sport*, Apr 2019, 22(4), 385-391.

WEBER, T., S. WASSERTHEURER, B. HAMETNER, S. PARRAGH, et al. Noninvasive methods to assess pulse wave velocity: comparison with the invasive gold standard and relationship with organ damage. *J Hypertens*, May 2015, 33(5), 1023-1031.

WILLIAMS, B., P. S. LACY, S. M. THOM, K. CRUICKSHANK, et al. Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study. *Circulation*, Mar 7 2006, 113(9), 1213-1225.

WOLFFENBUTTEL, B. H., C. M. BOULANGER, F. R. CRIJNS, M. S. HUIJBERTS, et al. Breakers of advanced glycation end products restore large artery properties in experimental diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Apr 14 1998, 95(8), 4630-4634.

ZACHARIAH, J. P., D. A. GRAHAM, S. D. DE FERRANTI, R. S. VASAN, et al. Temporal trends in pulse pressure and mean arterial pressure during the rise of pediatric obesity in US children. *J Am Heart Assoc*, May 8 2014, 3(3), e000725.

ZANCHETTI, A., M. G. BOND, M. HENNIG, A. NEISS, et al. Calcium antagonist lacidipine slows down progression of asymptomatic carotid atherosclerosis: principal results of the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA), a randomized, double-blind, long-term trial. *Circulation*, Nov 5 2002, 106(19), 2422-2427.

ZIEMAN, S. J., V. MELENOVSKY, L. CLATTENBURG, M. C. CORRETTI, et al. Advanced glycation endproduct crosslink breaker (alagebrium) improves endothelial function in patients with isolated systolic hypertension. *J Hypertens*, Mar 2007, 25(3), 577-583.

## 8 Přílohy

### Příloha 1

#### **Serum biomarkers, skin autofluorescence and other methods. Which parameter better illustrates the relationship between advanced glycation end products and arterial stiffness in the general population?**

Gelžinský J, Mayer O JR., Mlíková Seidlerová J, Mateřánková M, Mareš Š, Kordíková V, Trefil L, Cífková R, Filipovský J  
Hypertens Res, May 2021, 44(5), 518-527. DOI: 10.1038/s41440-020-00601-1

### Příloha 2

#### **Soluble receptor for advanced glycation end-products independently influences individual age-dependent increase of arterial stiffness.**

Gelžinský J, Mayer O JR., Mlíková Seidlerová J, Mateřánková M, Mareš Š, Kordíková V, Trefil L, Cífková R, Filipovský J  
Hypertens Res, Feb 2020, 43(2), 111-120. DOI: 10.1038/s41440-019-0347-y

### Příloha 3

#### **The role of advanced glycation end products in vascular aging: which parameter is the most suitable as a biomarker?**

Mayer O JR., Gelžinský J, Mlíková Seidlerová J, Mateřánková M, Mareš Š, Svobodová V, Trefil L, Cífková R, Filipovský J  
J Hum Hypertens, Mar 2021, 35(3), 240-249. DOI: 10.1038/s41371-020-0327-3

### Příloha 4

#### **The Influence of Vitamin K Status on the Individual Course of Age-dependent Arterial Stiffening.**

In 10th Anniversary of the European Association for Predictive, Preventive and Personalised (3P) Medicine - EPMA World Congress 2020.

Mayer O JR., Gelžinský J, Mlíková Seidlerová J, Kucera R, Mateřánková M, Mareš Š, Svobodová V, Topolčan O, Cífková R, Filipovský J, Vermeer C  
EPMA J. 2020 Aug 19;11(Suppl 1):1-133. DOI: 10.1007/s13167-020-00206-1



# Serum biomarkers, skin autofluorescence and other methods. Which parameter better illustrates the relationship between advanced glycation end products and arterial stiffness in the general population?

Július Gelžinský<sup>1,2</sup> · Otto Mayer Jr.<sup>1,2</sup> · Jitka Seidlerová<sup>1,2</sup> · Markéta Mateřánková<sup>1,2</sup> · Štěpán Mareš<sup>1,2</sup> · Veronika Kordíková<sup>1,2</sup> · Ladislav Trefil<sup>3</sup> · Renata Cífková<sup>4</sup> · Jan Filipovský<sup>1,2</sup>

Received: 26 June 2020 / Revised: 20 October 2020 / Accepted: 6 November 2020  
© The Japanese Society of Hypertension 2021

## Abstract

Stiffening of large arteries, clinically manifesting as increased aortic pulse wave velocity (PWV), is an inevitable outcome of aging. Among other mechanisms, impaired glucose metabolism plays an important role, leading to the deposition of advanced glycation end products (AGEs). This process is counterbalanced by the circulating soluble receptor for AGEs (sRAGE). We investigated the association between arterial stiffness on one side and multiple circulating biomarkers and the degree of skin deposition of AGEs on the other. In a cross-sectional design, 867 participants based on a general population sample (Czech post-MONICA studies) were examined. PWV was measured by SphygmoCor device (AtCor Medical Ltd.), while skin AGEs were measured using a dedicated autofluorescence method (AGE Reader mu<sup>®</sup>). To quantify the circulating status of AGEs, carboxymethyl lysine (CML) and sRAGE concentrations were assessed by ELISA, along with conventional glucose metabolism indicators. When analyzing the whole sample using multiple linear or logistic regression models and after adjustment for potential covariates, a significant association with PWV was found for fasting glycemia, HbA1c, sRAGE, skin AGEs, and the skin AGE-to-sRAGE ratio. Among these parameters, stepwise models identified the strongest association for the skin AGEs and AGE-to-sRAGE ratio, and this was also true when diabetic subjects were excluded. In contrast, neither CML nor its ratio relative to sRAGE showed any association with arterial stiffness. In conclusion, skin AGEs along with their ratio relative to sRAGE were closely associated with arterial stiffness and is a better indicator of the current status of deposited AGEs than other relevant factors.

**Keywords** AGEs · Carboxymethyl lysine · Glucose metabolism · Pulse wave velocity · SRAGE

**Supplementary information** The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41440-020-00601-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Július Gelžinský  
gelzinskyj@fnplzen.cz

<sup>1</sup> 2nd Department of Internal Medicine, Medical Faculty of Charles University and University Hospital, Pilsen, Czech Republic

<sup>2</sup> Biomedical Center, Medical Faculty of Charles University, Pilsen, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Clinical Biochemistry and Hematology, University Hospital, Pilsen, Czech Republic

<sup>4</sup> Centre for Cardiovascular Prevention of the First Faculty of Medicine, Charles University and Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic

## Introduction

Progressive remodeling and stiffening of large elastic arteries (collectively known as “arteriosclerosis”) is the most significant manifestation of vascular aging [1]. It can coexist with atherosclerosis (a development of atheromatous plaques) but has a different location, scope, and pathophysiological evolution [2, 3]. The progression of age-dependent arterial stiffening may substantially vary between individuals, as stiffening can be accelerated through several mechanisms [4]. The main process involved in progressive age-related stiffening is mechanical damage to the vascular wall that causes repeated fractures, fragmentation, and thinning of elastin. Pulse wave pressure is then transferred to more rigid collagen fibers, which clinically manifests as increased arterial stiffness and can be noninvasively



quantified as increased pulse wave velocity (PWV) [5]. It is evident that increased stiffness of large arteries signals excessive mortality risk, and PWV itself has been accepted as a very sensitive indicator of individual “vascular age” [6, 7].

Advanced glycation end products (AGEs) represent a heterogeneous family of highly oxidized compounds that arise from nonenzymatic reactions between reducing sugars and biological proteins or lipids [8–10]. Multiple different species of AGEs were identified: carboxymethyl lysine (CML), carboxyethyl lysine, pentosidine, pyrraline, etc [10]. A pathological role of AGEs has been presumed in several chronic diseases, such as diabetes, atherosclerosis, or chronic renal disease [8, 11–13]. The specific cell surface receptor for AGEs (RAGE) is expressed on multiple cell types, including endothelial cells, cardiomyocytes, smooth muscle cells, and epithelial cells [14], and binding of AGEs to RAGE activates several pathophysiological cascades (release of inflammatory cytokines, oxidative stress increase, etc.). Furthermore, the interaction of AGEs and collagen culminates in the cross-linking of collagen fibers in the vascular wall, which leads to its higher resistance to enzymatic proteolysis [15]. This leads to stiffening of the vessel wall and clinically manifests as increased PWV.

Among the two types of cellular RAGE (full-length membrane RAGE and N-truncated RAGE), there are two isoforms of this receptor that are cleaved from the cell surface by matrix metalloproteinase (cRAGE, the cleaved receptor for AGEs) or directly secreted (esRAGE, the endogenous secretory receptor for AGEs). These two isoforms (collectively quantified as sRAGE, soluble receptor for RAGE) are present in the bloodstream, where they act as decoys and can capture circulating AGEs, providing some kind of “natural defense” against AGE-RAGE-mediated pathophysiological processes (including the above mentioned cross-linking of collagen) [16, 17]. Multiple studies have reported an association between all these AGE-RAGE axis components and arterial stiffness [18–22].

Apart from assessing circulating biomarkers, it is now possible to measure some specific AGEs accumulated in the skin (namely, pentosidine, N<sup>ε</sup>-CML, and N<sup>ε</sup>-carboxyethyl lysine) using their autofluorescence capability [23]. Moreover, it has been recently proposed to use the ratio between ligands (a quantifiable representative of the AGE “superfamily”) and circulating receptors [24]. The rationale behind this approach is that this ratio better describes the current pathophysiological situation because one parameter summarizes the balance between harmful and protective factors.

In the present analysis, we aimed to explore associations between aortic PWV and various AGE-RAGE axis parameters, as well as conventional markers of glucose

metabolism. We intended to compare the performance of these biomarkers in terms of estimation of “vascular age” in a general population-based setting.

## Methods

All procedures performed in this study were performed under the principles of Good Clinical Practice and ethical standards formulated in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. The study protocol was approved by the local Ethics Committee of the University Hospital in Pilsen. Written informed consent was obtained from all participants included in the study. Data were stored and evaluated under the provisions of the Czech Data Protection Act and GDPR direction of the European Committee.

## Design and study population

The analysis represents a cross-sectional study of a general population-based sample.

The study population consisted of individuals examined as a part of the Czech post-MONICA study. A random 1% sample of Pilsen region residents aged 25–75 were selected from the General Health Insurance Registry; all details are reported elsewhere [25, 26]. Among the responders, 632 individuals were originally examined in 2008 and then subsequently attended a follow-up examination in 2016/17 using a nearly identical examination protocol; the data obtained at follow-up were used for this analysis. In addition, another sample of 399 individuals was examined in 2017 based on a new selection process and identical protocol. A total of 1031 individuals attended the examination programs, but 164 subjects had to be excluded because of technically impossible or inaccurate PWV measurements (because of body constitution, arrhythmia, or disagreement with this examination) or missing glucose metabolism data. The total analyzed population thus consisted of 867 subjects.

## Clinical examination

Information on each subject’s characteristics, personal and family history of coronary artery disease, lifestyle (smoking, drinking, exercise habits, etc.), and pharmacotherapy was obtained. Height and weight were measured using a SECA 767 (SECA GmbH & Co., Hamburg, Germany) scale with a telescopic measuring rod. Body mass index (BMI) was calculated as body weight (kg)/height<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>). Blood pressure (BP) was measured using the auscultatory technique and an appropriately sized cuff. Three measurements were performed on the right arm with the patient in the



sitting position. Average BP was determined by the average of a second and third measurement, and mean arterial pressure (MAP) was calculated as one-third systolic pressure plus two-thirds diastolic pressure.

Large artery properties were measured based on the 2006 Expert Consensus Document [27]. Measurements were obtained after 15 min of rest in the supine position in a quiet room using a Sphygmocor MM3 device (AtCor Medical Ltd., Sydney, NSW, Australia).

Aortic PWV was measured between the carotid and femoral arteries. It was calibrated by measuring BP on the contralateral arm before the recordings. The body surface distances between the carotid pulsation and jugular fossa and between the jugular fossa and femoral recording site were measured. The travel distance along the aorta was calculated by subtracting these two distances. Registrations of the pulse waves were ECG-gated, so the time shift between the appearance of the wave at the first and second sites could be calculated. Pulse wave velocity (PWV) was calculated as the ratio of the travel distance (m) and the transit time (s) and an average of two recordings was used for analysis. If the difference between the two recordings was  $>0.5$  m/s, another recording was executed. Skin AGEs were quantified by the AGE Reader mu device (Diagnoptics Technologies B.V., Groningen, Netherlands). Noninvasive ultraviolet light is used to measure the autofluorescence of specific AGEs in human skin (pentosidine, N<sup>ε</sup>-CML, and N<sup>ε</sup>-carboxyethyl lysine) [23]. Three recordings were performed in each subject and the average was used for analysis.

### Laboratory analysis

Venous blood samples were drawn after at least 12 h of fasting and all laboratory examinations were performed in series from aliquots stored at  $-80$  °C. The total and HDL cholesterol, triglycerides, serum creatinine and glucose levels were assessed from serum samples using a Cobas Mira/ROCHE analyzer (ROCHE Diagnostics, Basel, Switzerland) and commercially available kits of the same provider. The Friedewald equation was used to calculate LDL cholesterol, i.e.,  $LDL = \text{total cholesterol} - HDL - (TG/2.22)$ . Estimated glomerular filtration rate (eGFR) was assessed by the CKD-EPI formula (using serum creatinine, age, and gender) [28]. Glycated hemoglobin (HbA1c) was assessed using liquid chromatography.

The soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) concentration was quantified by ELISA methods using a Human RAGE Quantikine ELISA Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), while the status of circulating AGEs was quantified as serum CML using commercial ELISA kits (Cusabio Technology LLC, Houston, Tx, USA). esRAGE was not analyzed.

### Data analysis

For database management and statistical analyses, SAS software version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used. Data are presented as the median and interquartile range (because of the nonnormal distribution of most variables) or by relative frequencies (for categorized variables). Aortic PWV was used as the main indicator of central artery stiffness, and its value in the 4th quartile ( $\geq 9.7$  m/sec) was considered “high”. All seven explored parameters were divided into quartiles as follows:  $<5.0$ ,  $5.0$ – $5.1$ ,  $5.2$ – $5.6$  and  $\geq 5.7$  (fasting glycemia, mmol/L);  $<34$ ,  $34$ – $35$ ,  $36$ – $39$  and  $\geq 40$  (HbA1c, mmol/mol);  $<769.3$ ,  $769.3$ – $991.8$ ,  $991.9$ – $1321.1$  and  $\geq 1321.2$  (sRAGE, pg/mL);  $<94.4$ ,  $94.5$ – $169.6$ ,  $169.7$ – $273.0$  and  $\geq 273.1$  (CML, pg/mL);  $<1.8$ ,  $1.9$ – $2.1$ ,  $2.2$ – $2.5$  and  $\geq 2.6$  (skin AGEs, arbitrary unit);  $<82.2$ ,  $82.2$ – $156.2$ ,  $156.3$ – $296.6$  and  $\geq 296.7$  (CML/sRAGE  $\times 1000$ );  $<1.56$ ,  $1.57$ – $2.12$ ,  $2.13$ – $3.05$  and  $\geq 3.06$  (skin AGEs/ sRAGE,  $\times 1000$ ). Conventional risk factors were dichotomized into binary variables with limits based on the 6th European Guidelines for Cardiovascular Prevention [29]. Overt diabetes was defined as fasting glucose  $\geq 7.0$  mmol/L and/or the use of antidiabetic medication. Hypertension was defined as systolic BP  $\geq 140$  mmHg and/or diastolic BP  $\geq 90$  mmHg and/or treatment with antihypertensive medication. Conventional statistical methods were applied (see the relevant section of Results). Statistical significance was considered at the *P* value of 0.05.

## Results

### Characteristics of participants

The analyzed population consisted of 867 subjects representing a general population sample of the Pilsen region. The sex distribution was roughly equal, with 477 females (55%) and 390 males (45%), and the average age was  $56.7$  ( $\pm 13.8$ ) years. Mean PWV was  $8.76$  ( $\pm 2.19$ ) m/sec with average values for chosen glucose metabolism parameters as follows: fasting glycemia-  $5.40$  ( $\pm 0.93$ ) mmol/L, HbA1c-  $37.3$  ( $\pm 6.55$ ) mmol/mol, serum CML  $216.4$  ( $\pm 204.7$ ) pg/mL, skin AGEs  $2.26$  ( $\pm 0.57$ ), serum sRAGE  $1084.0$  ( $\pm 464.1$ ) pg/mL, CML-to-sRAGE ratio ( $\times 1000$ )  $247.2$  ( $\pm 321.5$ ) and skin AGE-to-sRAGE ratio ( $\times 1000$ )  $2.52$  ( $\pm 1.69$ ). Detailed characteristics of the participants are given in Table 1.

### Determinants of aortic stiffness

Bivariate associations between aortic PWV and other clinical parameters can be seen in Table 2 (Spearman’s



**Table 1** Baseline characteristics of study sample ( $n = 867$ ) [median (interquartile range) or  $n$  (factor proportion)]

<i>n</i>	867
Age [years]	56.7 (46.0–66.3)
Male gender [ $n(\%)$ ]	390 (45.0%)
Current smoking [ $n(\%)$ ]	176 (20.3%)
Body mass index [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ]	27.1 (24.4–30.6)
Body mass index $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ [ $n(\%)$ ]	254 (29.3)
Systolic blood pressure [mmHg]	130.7 (119.3–142.5)
Diastolic blood pressure [mmHg]	81.0 (74.7–88.0)
Mean arterial pressure	97.8 (91.0–105.3)
Tx/w antihypertensives [ $n(\%)$ ]	310 (35.8%)
Arterial hypertension <sup>a</sup> [ $n(\%)$ ]	476 (54.9%)
LDL cholesterol [mmol/L]	2.97 (2.40–3.63)
Tx/w statins [ $n(\%)$ ]	166 (19.1%)
Fasting glycemia [mmol/L]	5.20 (4.90–5.70)
Fasting glycemia $\geq 5.6 \text{ mmol}/\text{L}$ [ $n(\%)$ ]	272 (31.4)
HbA1c [mmol/mol]	36.0 (34.0–40.0)
HbA1c $\geq 42 \text{ mmol}/\text{mol}$ [ $n(\%)$ ]	146 (16.8)
Tx/w antidiabetics [ $n(\%)$ ]	64 (7.4%)
Overt diabetes <sup>b</sup> [ $n(\%)$ ]	75 (8.7%)
Serum creatinine [ $\mu\text{mol}/\text{L}$ ]	73.0 (65.0–83.0)
eGFR [mL/min]	89.1 (77.9–99.9)
eGFR $< 60 \text{ mL}/\text{min}$ [ $n(\%)$ ]	50 (5.8)
Aortic pulse wave velocity [m/sec]	8.35 (7.25–9.70)
Serum CML [pg/mL]	169.6 (94.4–273.0)
Skin AGEs [A.U.]	2.20 (1.87–2.57)
Serum sRAGE [pg/mL]	991.8 (769.3–1321.2)
CML to sRAGE [ratio $\times 1000$ ]	156.3 (82.18–296.65)
skin AGEs to sRAGE [ratio $\times 1000$ ]	2.13 (1.56–3.05)

Tx/w treatment with, ACEi angiotensin-converting enzyme inhibitors, ARBs angiotensin II receptor blockers, HDL high density lipoprotein, LDL low density lipoprotein, eGFR estimated glomerular filtration (by CKD-EPI standard), CML carboxymethyl lysine, skin AGEs skin autofluorescence advanced glycation end products, sRAGE soluble receptor for advanced glycation end products

<sup>a</sup>Systolic blood pressure  $\geq 140$  and/or diastolic blood pressure  $\geq 90$  mmHg and/or antihypertensive treatment

<sup>b</sup>Fasting glycaemia  $\geq 7 \text{ mmol}/\text{L}$  and/or treatment with antidiabetics

correlation coefficient was used because of the non-normality of PWV). Using PWV as a reference variable, a significant correlation was found with common cardiovascular risk factors, namely, age, BMI, MAP, and eGFR. Moreover, a significant correlation was found between PWV and all chosen markers of glucose metabolism, i.e., fasting glycemia, HbA1c, serum CML, skin AGEs, serum sRAGE, and both calculated ratios (CML to sRAGE and skin AGEs to sRAGE). Unsurprisingly, the strongest correlation was found with age and MAP.

The differences in the same parameters between the upper and lower quartiles of PWV were also calculated

and can be seen in the right part of Table 2. Significant differences in all the parameters except LDL cholesterol were found between the upper and lower quartiles of PWV.

In a semicontinuous manner (Fig. 1), PWV significantly increased across quartiles by fasting glycemia, skin AGEs, and the skin AGE-to-sRAGE ratio. A positive significant trend in PWV was also observed across HbA1c quartiles (with  $p < 0.0001$ , not in Figure). An inverse trend (with only borderline significance) was observed across serum sRAGE quartiles, while differences in PWV by serum CML or by CML-to-sRAGE ratio quartiles remained insignificant (Fig. 1).

A series of multivariate linear regression analyses with PWV as a dependent continuous variable was performed to assess its association with the explored parameters (glucose metabolism or AGE-RAGE axis parameters), and the results are shown in Table 3. As a first step, each of the seven explored parameters was tested in their own multivariate model (upper part of Table 3). All confounders known to be associated with arterial stiffness (age, sex, smoking, MAP, pharmacotherapy, etc.) were considered potential covariates (coefficients for these factors are not depicted in the table for this particular analysis). A significant association with PWV was found with fasting glycemia, HbA1c, serum sRAGE, skin AGEs and the skin AGE-to-sRAGE ratio. There was no association between PWV and the serum CML or CML-to-sRAGE ratio. Moreover, after excluding the diabetic subjects from the analyses, the association with HbA1c completely disappeared, while the association with the remaining parameters remained unchanged (Table 3, upper part). In the next step, all explored parameters (with the exception of HbA1c) were included in stepwise regression, but due to collinearity, we performed one model for directly measured parameters (serum CML, serum sRAGE, skin AGEs) and the second for their ratios (CML to sRAGE and skin AGEs to sRAGE). In addition to the conventional PWV covariates (age, sex, MAP, etc.), the association remained significant with fasting glycemia, serum sRAGE, skin AGEs and the skin AGE-to-sRAGE ratio. No association was found between PWV and the serum CML or CML-to-sRAGE ratio. Again, the same models were then applied to nondiabetic subjects only, and the association remained virtually unchanged for all the selected parameters.

Because of the strong collinearity of fasting glycemia and HbA1c (correlation coeff. 0.58,  $p > 0.0001$ ), these two glucose metabolism parameters were not used in the same model. Fasting glycemia was chosen because of its much stronger association with PWV. However, we repeated all stepwise regression models where HbA1c was used as a covariate instead of fasting glycemia (Supplementary

**Table 2** Bivariate association of aortic pulse wave velocity (PWV) and its covariates in continuous manner (Spearman's correlation); differences in these factors between bottom and top quartile of PWV

	Spearman's <i>R</i>	<i>P</i> value	Low PWV <sup>a</sup>	High PWV <sup>b</sup>	<i>P</i> value <sup>c</sup>
Age	0.604	<0.0001	45.8 (11.8)	68.0 (10.1)	<0.0001
Body mass index	0.323	<0.0001	25.7 (4.6)	29.2 (4.6)	<0.0001
Mean arterial pressure	0.409	<0.0001	91.3 (9.6)	102.6 (11.2)	<0.0001
LDL-cholesterol	0.073	0.0313	2.89 (0.81)	3.06 (1.01)	0.1343
eGFR	-0.351	<0.0001	96.6 (16.4)	78.1 (18.2)	<0.0001
Fasting glycemia	0.299	<0.0001	5.06 (0.67)	5.81 (1.30)	<0.0001
HbA1c	0.407	<0.0001	34.9 (4.8)	41.4 (8.9)	<0.0001
Serum sRAGE	-0.215	<0.0001	1174.7 (429.6)	955.0 (466.0)	<0.0001
Serum CML	0.124	0.0002	190.4 (181.3)	246.9 (193.4)	0.0002
Skin AGEs	0.437	<0.0001	1.97 (0.44)	2.62 (0.59)	<0.0001
CML to sRAGE ratio	0.198	<0.0001	193.5 (227.2)	323.5 (429.5)	<0.0001
Skin AGEs to sRAGE ratio	0.403	<0.0001	1.92 (1.03)	3.40 (2.52)	<0.0001

<sup>a</sup>Bottom quartile, i.e., <7.25 m/s<sup>b</sup>Top quartile, i.e., equal or more than 9.7 m/s<sup>c</sup>By Mann-Whitney U test

Table 1). The  $\beta$  coefficient for HbA1c was lower than that for fasting glycemia in the original model (0.05 for HbA1c versus 0.4189 for fasting glycemia), and the predictive power of HbA1c completely disappeared after excluding the diabetic subjects from analyses. On the other hand, the patterns of association for the main explored parameters (i.e., serum sRAGE, serum CML, skin AGEs, and both ratios) with PWV were more or less repeated (see Supplementary Table 1 for detailed results).

Finally, a series of multiple logistic regression models were used to identify the predictive power of the explored parameters for increased arterial stiffness (defined as  $PWV \geq 9.7$  m/s, i.e., 4th quartile of PWV) adjusted for other major covariates (Table 4). Parameters were dichotomized using the 4th quartile as the cutoff (with the only exception being serum sRAGE where the 1st quartile was used). In individual models, a significant association was found with high fasting glycemia, high HbA1c, low serum sRAGE status, high skin AGEs, and high skin AGE-to-sRAGE ratio. No significant association was found with high serum CML or high CML-to-sRAGE ratio again. When excluding diabetic subjects, the predictive power of low serum sRAGE disappeared, while a significant association with other parameters remained.

Two different models were used again for stepwise regressions (for directly measured parameters and their ratios). Very similar associations were found with  $PWV \geq 9.7$  m/s as in individual models, including the loss of significance of low serum sRAGE after excluding nondiabetic subjects (bottom part of Table 4).

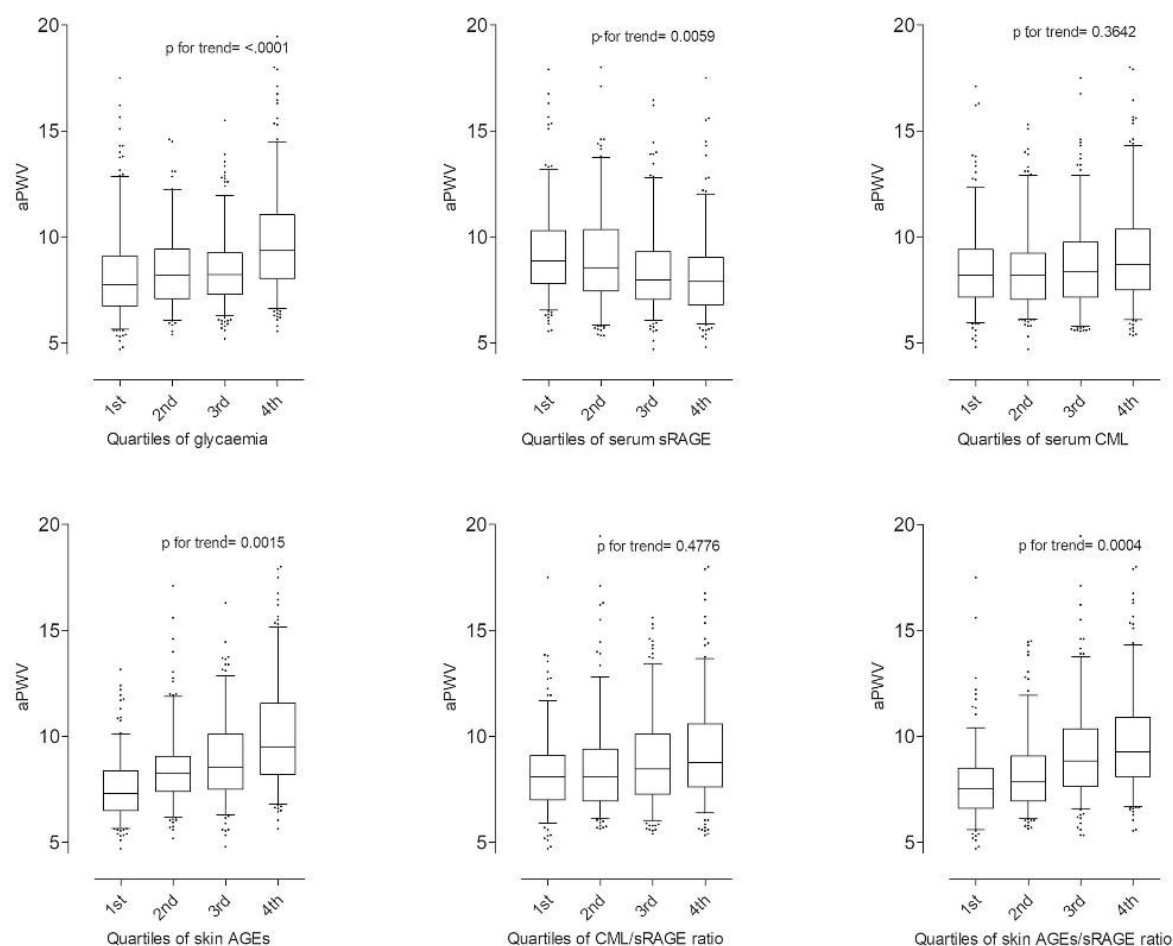
In addition, a similar pattern of associations was observed even if high HbA1c, not high fasting glycemia, was used as a covariate in all analyses listed in Table 4 (see Supplementary Table 2).

## Discussion

In the present study, we confirmed that skin deposition of AGEs, quantified by the dedicated autofluorescence method, was significantly positively associated with arterial stiffness (aortic PWV) in a random sample of the general population, and a strong association was also observed if the ratio between skin AGEs and circulating concentration of the sRAGE ratio was used instead of single parameters. This skin AGE-to-RAGE ratio in the top quartile was associated with an approximately twofold higher risk of increased arterial stiffness (defined as  $PWV \geq 9.7$  m/sec), even after full adjustment for potential covariates, including conventional glucose metabolism parameters. As already mentioned, the ratio between the ligand (in our case skin AGEs) and its circulating receptor (esRAGE or sRAGE) seems to be more biologically plausible since it represents, in one joint parameter, the individual course of deposition of AGEs in solid tissues on one side and the activity of protective factors on the other. A recent summary report [24] advocates for this approach, which is supported not only by the present results but also by our other results. In our previous prospective study on 536 longitudinally followed subjects, we observed that an increased skin AGE-to-sRAGE ratio ( $\geq 3.3$ ) was associated with a twofold higher relative risk of accelerated age-dependent arterial stiffening (defined as a  $\geq 2$  m/sec increase in PWV per age decade). The accuracy of the ratio was higher in this respect than that for the individual factors (either skin AGEs or sRAGE) [30].

The association between skin AGEs and arterial stiffness has already been reported in several (usually smaller) cross-sectional studies, but none of them was set into an explicitly random general population. A significant positive association between skin AGEs and aortic PWV was reported in  $\approx 90$





**Fig. 1** Distribution of PWV by quartiles of individual parameters of glucose metabolism and the AGE-RAGE axis (box and whisker plots;  $P$  value adjusted for age, sex, and MAP); limits of quartiles are as follows: <math><4.9</math>, 4.9–5.2, 5.3–5.6 and

[ $\mu\text{g/mL}$ ]; 94.4, 94.5–169.6, 169.7–273.0 and \mu\text{g/mL}]; <math><1.8</math>, 1.9–2.1, 2.2–2.5 and \times 1000]; <math><1.56</math>, 1.57–2.1 2, 2.13–3.05 and \times 1000]

peritoneal or hemodialysis patients [31], and a similar phenomenon was found in 120 Japanese end-stage renal disease patients [32]. The close correlation between skin AGEs and PWV was also proven in smaller groups of patients with type I diabetes and high cardiovascular risk [33, 34] as well as in 218 hypertensive patients [35]. The largest part of the evidence yet represents the Maastricht study, which confirmed the independent relation between aortic PWV and skin AGEs in 862 participants, belonging to three predefined groups- type II diabetic patients, those with impaired glucose metabolism and control normoglycemic subjects [36]. We confirmed the association between skin AGEs and arterial stiffness in the random general population sample. It is also important to stress that the relation between the skin AGE-to-sRAGE ratio and increased arterial stiffness remained in our sample even after diabetic patients were excluded. In addition, when we further excluded those with hypertension, eGFR <math><60</math> mL/min, and any chronic

treatment or manifest disease, the association between the skin AGE-to-sRAGE ratio and PWV remained significant [with  $\beta = 0.121$  (SE 0.057),  $p = 0.035$ ] (*not in the Results*). Therefore, it can probably be presumed that the identified association seems to be universal and sensitive enough to confirm the use of the skin AGE-to-sRAGE ratio as a relatively simple biomarker of “vascular age” in generally healthy subjects (i.e., in primary prevention).

A further question could be raised: to what extent is the proposed biomarker (skin AGE-to-sRAGE ratio) more accurate than conventional indicators of glucose metabolism (such as fasting glycemia or HbA1c) with regard to arterial stiffness? The highest predictive power regarding increased PWV was found for impaired fasting glucose ( $>5.6$  mmol/L), which is the simplest parameter indeed and establishes a prediabetic state [37]. On the other hand, increased skin AGEs (or a high skin AGE-to-sRAGE ratio) maintained their significant

**Table 3** Multivariate association between aortic pulse wave velocity and explored parameters of glucose metabolism or RAGE-AGE axis

	All subjects ( <i>n</i> = 867)		Nondiabetic subjects ( <i>n</i> = 792)	
	$\beta$ coeff. (std. error)	<i>P</i> value	$\beta$ coeff. (std. error)	<i>P</i> value
<b>Individual models<sup>a</sup></b>				
Fasting glycaemia	0.4195 (0.0718)	<0.0001	0.4882 (0.1013)	<0.0001
HbA1c	0.0487 (0.0116)	<0.0001	-0.0027 (0.0163)	0.8683
Serum sRAGE	-0.0003 (0.0001)	0.041	-0.0004 (0.0001)	0.006
Serum CML	-0.0001 (0.0003)	0.901	-0.0002 (0.0003)	0.536
Skin AGEs	0.5151 (0.1341)	<0.0001	0.3195 (0.1355)	0.017
CML to sRAGE ratio	0.0001 (0.0002)	0.619	0.0001 (0.0001)	0.788
Skin AGEs to sRAGE ratio	0.1256 (0.0372)	0.001	0.1092 (0.0366)	0.003
<b>Full step-wise model A<sup>b</sup></b>				
Age	0.0571 (0.0058)	<0.0001	0.0576 (0.0057)	<0.0001
Male gender	0.2243 (0.1163)	0.054	0.3074 (0.1159)	0.008
History of vascular disease	0.5206 (0.2225)	0.020	<i>not entered</i>	-
Current smoking	-0.3983 (0.1435)	0.006	-0.3219 (0.1408)	0.023
Mean arterial pressure	0.0451 (0.0054)	<0.0001	0.0426 (0.0052)	<0.0001
Fasting glycemia	0.4189 (0.0634)	<0.0001	0.5054 (0.1001)	<0.0001
Serum sRAGE	-0.0002 (0.0001)	0.089	-0.0003 (0.0001)	0.001
Serum CML	<i>not entered</i>	-	<i>not entered</i>	-
Skin AGEs	0.5281 (0.1319)	<0.0001	0.4178 (0.1331)	0.001
Constant	-2.8033 (0.6416)	<0.0001	-2.1627 (0.7252)	0.003
<b>Full step-wise model B<sup>c</sup></b>				
Age	0.0634 (0.0049)	<0.0001	0.0648 (0.0048)	<0.0001
Male gender	0.2437 (0.1160)	0.036	0.3412 (0.1155)	0.001
History of vascular disease	0.5198 (0.2265)	0.022	<i>not entered</i>	-
Current smoking	-0.3026 (0.1391)	0.030	-0.2362 (0.1356)	0.082
Mean arterial pressure	0.0443 (0.0054)	<0.0001	0.0430 (0.0052)	<0.0001
LDL cholesterol	0.1262 (0.0627)	0.045	<i>not entered</i>	-
Treatment with antihypertensives	0.2819 (0.1360)	0.038	0.2239 (0.1321)	0.0905
Fasting glycemia	0.4448 (0.0625)	<0.0001	0.4922 (0.0997)	<0.0001
CML to sRAGE ratio	<i>not entered</i>	-	<i>not entered</i>	-
Skin AGEs to sRAGE ratio	0.1162 (0.0360)	0.001	0.1036 (0.0355)	0.004
Constant	-2.4487 (0.6074)	<0.0001	-2.2438 (0.6770)	0.001

Multiple linear regression with PWV as dependent continuous variable

<sup>a</sup>Each of seven parameters had its own model, following covariates were also included into regression models: age, gender, history of vascular disease, current smoking, body mass index, mean arterial pressure, LDL-cholesterol, eGFR, treatment with any antihypertensives, with statins or with antidiabetics (*only in "all subjects" analyses*)<sup>b</sup>Only directly measured parameters considered (along with above mentioned covariates with exception of HbA1c)<sup>c</sup>Only ratios (CML to sRAGE and skin AGEs to sRAGE) considered (along with above mentioned covariates with exception of HbA1c)

association with arterial stiffness even if adjusted for impaired fasting glucose. Regarding increased PWV, skin AGEs probably have more informative value than fasting glycemia. We can speculate that the expression of AGE deposition in solid tissues represents a more robust biomarker rather than a variable parameter, such as fasting glucose. Something similar can be said about HbA1c, which is also a product of tissue glycation but at another pathophysiological level.

Nevertheless, HbA1c is an established clinical marker of long-term glucose status in diabetic patients; however, it probably lacks sufficient sensitivity in less affected subjects. This is evident from the fact that the positive association between PWV and HbA1c (as continuous variables) disappeared if diabetic subjects were excluded from the analysis.

Surprisingly, we did not find any significant association between PWV and serum CML in our study

**Table 4** Adjusted association of high arterial stiffness (PWV  $\geq$  9.7 m/sec i.e., 4th quartile of PWV) and explored parameters of glucose metabolism or RAGE-AGE axis

Individual models <sup>a</sup>	All subjects ( <i>n</i> = 867)		Nondiabetic subjects ( <i>n</i> = 792)	
	Odds ratio (95% conf. intervals)	<i>P</i> value	Odds ratio (95% conf. intervals)	<i>P</i> value
Individual models <sup>a</sup>				
Fasting glycemia $\geq$ 5.7 mmol/L	2.296 (1.515–3.481)	<0.0001	2.757 (1.770–4.293)	<0.0001
HbA1c $\geq$ 40 mmol/mol	2.048 (1.344–3.122)	0.001	1.783 (1.141–2.786)	0.011
Serum sRAGE <769.3 pg/mL	1.517 (1.016–2.265)	0.042	1.457 (0.948–2.240)	0.086
Skin AGEs $\geq$ 2.6 A.U.	1.924 (1.260–2.936)	0.002	2.046 (1.301–3.217)	0.002
Serum CML $\geq$ 273.1 pg/mL	1.028 (0.677–1.561)	0.896	0.947 (0.600–1.493)	0.813
CML to sRAGE $\geq$ 3.06	1.344 (0.897–2.014)	0.152	1.267 (0.816–1.968)	0.291
Skin AGEs to sRAGE $\geq$ 297.7	1.930 (1.295–2.877)	0.001	1.902 (1.239–2.919)	0.003
Step-wise model A <sup>b</sup>				
Age $\geq$ 65	4.509 (2.995–6.789)	<0.0001	5.841 (3.769–0.52)	<0.0001
Male gender	<i>not entered</i>	–	1.460 (0.973–2.189)	0.067
History of vascular disease	1.710 (0.913–3.202)	0.094	<i>not entered</i>	–
Arterial hypertension	3.329 (2.163–5.124)	<0.0001	3.072 (1.947–4.849)	<0.0001
Fasting glycemia $\geq$ 5.7 mmol/L	2.547 (1.728–0.754)	<0.0001	2.698 (1.733–4.201)	<0.0001
sRAGE <769.3 pg/mL	1.598 (1.074–2.378)	0.021	1.446 (0.938–2.229)	0.095
Skin AGEs $\geq$ 2.6 A.U.	1.916 (1.268–2.894)	0.002	1.983 (1.271–3.094)	0.003
Step-wise model B <sup>c</sup>				
Age $\geq$ 65	5.095 (3.448–7.529)	<0.0001	6.681 (4.390–10.168)	<0.0001
Male gender	<i>not entered</i>	–	1.480 (0.988–2.216)	0.057
History of vascular disease	1.754 (0.942–3.264)	0.076	<i>not entered</i>	–
Arterial hypertension	3.345 (2.175–5.145)	<0.0001	3.129 (1.985–4.933)	<0.0001
Fasting glycemia $\geq$ 5.7 mmol/L	2.536 (1.720–3.738)	<0.0001	2.684 (1.725–4.176)	<0.0001
CML to sRAGE $\geq$ 296.7	<i>not entered</i>	–	<i>not entered</i>	–
Skin AGEs to sRAGE $\geq$ 3.06	1.978 (1.338–2.925)	0.001	1.842 (1.197–2.835)	0.005

Multiple logistic regression models with PWV  $\geq$  9.7 m/sec used as the dependent variable

*HbA1c* glycated hemoglobin, *sRAGE* soluble receptor for advanced glycation end products, *CML* carboxymethyl lysine, *AGEs* advanced glycation end products, *Tx/w* treatment with

<sup>a</sup>Each of seven parameters had its own model, following covariates were also included into logistic regression models: Fasting glycemia  $\geq$ 5.7 mmol/L, age  $\geq$ 65, male gender, history of vascular disease, smoking status, BMI  $\geq$  30, arterial hypertension, LDL cholesterol  $\geq$ 2.5, estimated GFR < 60, treatment with a statin and overt diabetes (*only in “all subjects” analyses*)

<sup>b</sup>Only directly measured parameters with exception of HbA1c considered (along with above-mentioned covariates)

<sup>c</sup>Only ratios (CML to sRAGE and skin AGEs to sRAGE) considered (along with above-mentioned covariates)

(or CML-to-sRAGE ratio). The reason can be the biological behavior of the chosen marker, i.e., CML. Although this compound is the most frequently used for quantification of the general status of circulating AGEs, it is probably less appropriate in the context of arterial stiffness. CML belongs to the noncrosslinking group of the AGE family because it can bind to only one protein residue and hence is unable to form a bridge between two molecules [38]. In contrast, pentosidine, one of the AGEs estimated by the auto-fluorescence method in the skin, is a cross-linking AGE [38]. An association between serum CML and PWV was previously reported in hypertensive patients [20], but this can reflect only the indirect relation between arterial stiffness and increased development of AGEs (reflected by increased circulating CML status). Thus, the lack of association between serum CML and PWV in our study may only reflect a lower sensitivity of CML in the setting of a relatively healthy population. In addition, we found no

correlation between serum CML concentration and skin AGEs.

The final question remains: is there an advantage to quantifying the AGE-RAGE axis status in comparison with conventional risk factors, especially regarding vascular age?

First, it is necessary to stress that there are crucial pathophysiological differences between atherosclerosis (development of atheromatous plaques) and arteriosclerosis (stiffening of arterial media) and that the individual cardiovascular risk is given by the interaction of both of these phenomena. Generally, increased arterial stiffness (arteriosclerosis) is strongly related to age, sex, and BP and only somewhat to impaired glucose metabolism. The role of other major risk factors (namely, smoking and hypercholesterolemia) is less convincing or only indirect. On the other hand, notably due to their potential to form cross-links, AGEs are directly involved in the pathophysiology of arterial stiffness. Indeed, the association of skin AGEs and



their ratio to sRAGE remained independently associated with increased arterial stiffness, even if all other major cardiovascular risk factors were considered. The same situation was present after the individual level of SCORE [39] (as an established tool for estimation of cardiovascular risk, attributable to conventional factors) was used instead of an individual conventional cardiovascular risk factor (not in the Results). Thus, we believe that the proposed biomarker (skin AGE-to-sRAGE ratio) can be potentially useful, namely, in terms of individual “vascular age” estimation.

### Study limitations

Our study cohorts were based on random population samples that depended on the compliance of the subjects with the examination. Healthier subjects are known to be generally more willing to attend surveys. Thus, our results cannot be fully generalized, notably to more vascular-affected individuals.

There are multiple circulating AGEs, and in our current study, we used only CML as a representative circulating AGE. It cannot be excluded that other existing circulating “members of the AGE family” (for example, high-mobility group box 1) show better accuracy than CML (in the context of a pathophysiological role in arterial stiffness).

Finally, our analysis is based on a single measurement of AGE-RAGE axis parameters only. However, it is already known that some of these factors may vary over time, for example, according to the immediate status of glucose metabolism or as a response to acute stress situations (this is evident for the circulating status of sRAGE, for example). Our subjects should be nominally long-term stable, but some intraindividual variability of parameters measured cannot be fully excluded.

### Conclusions

Skin autofluorescence AGEs, especially if related to the circulating status of sRAGE, showed very good concordance with arterial stiffness in relatively healthy subjects. Due to its noninvasive nature and quick result acquisition, it seems to be a promising tool for individual “vascular age” estimation, which could also refine the individualization of cardiovascular risk in primary prevention, adding to the usual approach (based on conventional cardiovascular risk factors).

**Acknowledgements** We would like to acknowledge the hard work of all investigators and other coworkers (study nurses, laboratory technicians, medical students, etc.) who participated in the post-MONICA projects and, last but not least, all study subjects who voluntarily responded to the very time-consuming clinical examination program.

The study realization was supported by the Health Development Agency of Czech Ministry of Health (project 15-27109), Charles University Research Fund (PROGRES, project Q39), and by Ministry of Health, Czech Republic - conceptual development of research organization. (FNPI, 00669806).

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

### References

- O'Rourke MF, Mancia G. Arterial stiffness. *J Hypertens.* 1999;17:1–4.
- Robert L. Aging of the vascular-wall and atherosclerosis. *Exp Gerontol.* 1999;34:491–501.
- Folkow B, Svanborg A. Physiology of cardiovascular aging. *Physiol Rev.* 1993;73:725–64.
- Cecelja M, Chowieńczyk P. Dissociation of aortic pulse wave velocity with risk factors for cardiovascular disease other than hypertension: a systematic review. *Hypertension.* 2009;54:1328–36.
- Collaboration TRVfAS. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: ‘establishing normal and reference values’. *Eur Heart J.* 2010;31:2338–50.
- Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:1318–27.
- Herbert A, Cruickshank JK, Laurent S, Boutouyrie P. Establishing reference values for central blood pressure and its amplification in a general healthy population and according to cardiovascular risk factors. *Eur Heart J.* 2014;35:3122–33.
- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006;114:597–605.
- Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Investig.* 1997;99:457–68.
- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia.* 2001;44:129–46.
- Kalousova M, Zima T, Tesar V, Dusilova-Sulkova S, Skrha J. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. *Mutat Res.* 2005;579:37–46.
- Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis.* 2008;196:9–21.
- Georgianos PI, Pikilidou MI, Liakopoulos V, Balaskas EV, Zebekakis PE. Arterial stiffness in end-stage renal disease-pathogenesis, clinical epidemiology, and therapeutic potentials. *Hypertens Res.* 2018;41:309–19.
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YCE, et al. Cloning and expression of a cell-surface receptor for advanced glycosylation end-products of proteins. *J Biol Chem.* 1992;267:14998–5004.
- Vasan S, Zhang X, Kapurniotu A, Bemhagen J, Teichberg S, Basgen J, et al. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature.* 1996;382:275–8.

16. Koyama H, Yamamoto H, Nishizawa Y. RAGE and soluble RAGE: potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Mol Med.* 2007;13:625–35.
17. Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ Jr, Chow WS, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med.* 1998;4:1025.
18. Gelžinský J, Mayer O Jr, Seidlerová J, Mateřánková M, Mareš Š, Kordíková V, et al. Soluble receptor for advanced glycation end-products independently influences individual age-dependent increase of arterial stiffness. *Hypertens Res.* 2020;43:111–20.
19. Mayer O, Seidlerová J, Filipovsky J, Vagovicova P, Wohlfahrt P, Cifkova R, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products and increased aortic stiffness in the general population. *Hypertens Res.* 2016;39:266–71.
20. McNulty M, Mahmud A, Feely J. Advanced glycation end-products and arterial stiffness in hypertension. *Am J Hypertens.* 2007;20:242–7.
21. Semba RD, Najjar SS, Sun K, Lakatta EG, Ferrucci L. Serum carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, is associated with increased aortic pulse wave velocity in adults. *Am J Hypertens.* 2009;22:74–9.
22. Dimitriadis K, Tsioufis C, Kasiakogias A, Miliou A, Poulakis M, Kintis K, et al. Soluble receptor for advanced glycation end-product levels are related to albuminuria and arterial stiffness in essential hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013;23:382–8.
23. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN, Links TP, Jager JJ, Alderson NL, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia.* 2004;47:1324–30.
24. Prasad K. Is there any evidence that AGE/sRAGE is a universal biomarker/risk marker for diseases? *Mol Cell Biochem.* 2019;451:139–44.
25. Cifkova R, Skodova Z, Bruthans J, Adamkova V, Jozifova M, Galovcova M, et al. Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. *Czech MONICA Czech post-Monica Atherosclerosis.* 2010;211:676–81.
26. Wohlfahrt P, Cifkova R, Krajcoviechova A, Sulc P, Bruthans J, Linhart A, et al. Comparison of three office blood pressure measurement techniques and their effect on hypertension prevalence in the general population. *J Hypertens.* 2020;38:656–62.
27. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J.* 2006;27:2588–605.
28. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF III, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009;150:604–12.
29. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: the Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis.* 2016;2016:207–74.
30. Mayer O, Gelžinský J, Seidlerová J, Mateřánková M, Mareš Š, Svobodová V, et al. The role of advanced glycation end products in vascular aging: which parameter is the most suitable as a biomarker? *J Hum Hypertens.* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41371-020-0327-3>. [Epub ahead of print].
31. Mac-Way F, Couture V, Utescu MS, Ignace S, De Serres SA, Loignon RC, et al. Advanced glycation end products, aortic stiffness, and wave reflection in peritoneal dialysis as compared to hemodialysis. *Int Urol Nephrol.* 2014;46:817–24.
32. Ueno H, Koyama H, Tanaka S, Fukumoto S, Shinohara K, Shoji T, et al. Skin autofluorescence, a marker for advanced glycation end product accumulation, is associated with arterial stiffness in patients with end-stage renal disease. *Metabolism.* 2008;57:1452–57.
33. Llauradó G, Ceperuelo-Mallafre V, Vilardell C, Simó R, Gil P, Cano A, et al. Advanced glycation end products are associated with arterial stiffness in type 1 diabetes. *J Endocrinol.* 2014;221:405–13.
34. Ageev FT, Vitsenia MV, Smirnova MD, Mihailov GV. The relationship between level of end-products of tissue glycation and pulse wave velocity in non-diabetic patients with cardiovascular disease. *Kardiologija.* 2015;55:63–7.
35. Liu CY, Huang QF, Cheng YB, Guo QH, Chen Q, Li Y, et al. A Comparative Study on Skin and Plasma Advanced Glycation End Products and Their Associations with Arterial Stiffness. *Pulse (Basel).* 2017;4:208–18.
36. van Eupen MG, Schram MT, van Sloten TT, Scheijen J, Sep SJ, van der Kallen CJ, et al. Skin Autofluorescence and Pentosidine Are Associated With Aortic Stiffening: the Maastricht Study. *Hypertension.* 2016;68:956–63.
37. Stevens JW, Khunti K, Harvey R, Johnson M, Preston L, Woods HB, et al. Preventing the progression to type 2 diabetes mellitus in adults at high risk: a systematic review and network meta-analysis of lifestyle, pharmacological and surgical interventions. *Diabetes Res Clin Pr.* 2015;107:320–31.
38. Ahmed N. Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pr.* 2005;67:3–21.
39. Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J.* 2003;24:987–1003.





# Soluble receptor for advanced glycation end-products independently influences individual age-dependent increase of arterial stiffness

Július Gelžinský<sup>1,2</sup> · Otto Mayer Jr.<sup>1,2</sup> · Jitka Seidlerová<sup>1,2</sup> · Markéta Mateřánková<sup>1,2</sup> · Štěpán Mareš<sup>1,2</sup> · Veronika Kordíková<sup>1,2</sup> · Ladislav Trefil<sup>3</sup> · Renata Cífková<sup>4</sup> · Jan Filipovský<sup>1,2</sup>

Received: 23 May 2019 / Revised: 14 September 2019 / Accepted: 25 September 2019  
© The Japanese Society of Hypertension 2019

## Abstract

Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) have been suggested to have a protective role in neutralizing advanced glycation end-products (AGEs) and their pathological effects on vessel walls. We aimed to investigate the association between the circulating concentration of sRAGE and the dynamics of arterial wall stiffening as a manifestation of vascular aging in the general population. In a prospective cohort study, we longitudinally followed 530 general-population-based subjects (subsample of Czech post-MONICA study). Aortic pulse wave velocity (PWV) was measured twice (at baseline and after ~8 years of follow-up) using a SphygmoCor device (AtCor Medical Ltd), and the intraindividual change in PWV per year ( $\Delta$ PWV/year) was calculated. Concentrations of sRAGE were assessed at baseline by ELISA (R&D Systems). The average  $\Delta$ PWV/year significantly decreased across the sRAGE quintiles ( $p = 0.048$ ), and a drop by one sRAGE quintile was associated with an ~21% increase in the relative risk of accelerated age-dependent stiffening ( $\Delta$ PWV/year  $\geq 0.2$  m/s). Subjects in the bottom quintile of sRAGE (<889.74 pg/mL) had a fully adjusted odds ratio of accelerated stiffening of 1.72 (95% CI: 1.06–2.79),  $p = 0.028$ , while those with high sRAGE concentrations ( $\geq 1695.2$  pg/mL) showed the opposite effect [odds ratio 0.55 (95% CI: 0.33–0.90),  $p = 0.017$ ]. In conclusion, the circulating status of sRAGE independently influenced the individual progression of arterial stiffness over time. This finding strongly supports the hypothesis that high sRAGE has a protective role against vascular aging.

**Keywords** AGEs · sRAGE · Pulse wave velocity · Vascular aging · Prospective study · General population

## Introduction

Progressive remodeling and stiffening of large elastic arteries (also known as arteriosclerosis) is the most

significant manifestation of vascular aging [1]. Progressive arterial stiffening is responsible for the age-dependent increase in central systolic or pulse pressure and the higher prevalence of isolated systolic hypertension [2]. Arteriosclerosis can coexist with atherosclerosis (a development of atheromatous plaques) but has a different pathophysiological evolution, location, and scope [3, 4].

The main pathological process involved in progressive age-related stiffening of large arteries is mechanical damage to the vascular wall caused by repeated fractures, fragmentation, and thinning of elastin in vessel walls. Consequently, the pulse wave is transferred to more rigid collagen fibers; loss of elasticity of the arterial wall manifests clinically as increased pulse wave velocity (PWV) [5].

The “natural” progression of age-dependent arterial stiffening (increase in PWV) can be individually accelerated through several mechanisms [6, 7]. Advanced glycation end-products (AGEs) are highly oxidizing compounds that

✉ Otto Mayer Jr.  
mayero@fnplzen.cz

<sup>1</sup> 2nd Department of Internal Medicine, Medical Faculty of Charles University and University Hospital, Pilsen, Czech Republic

<sup>2</sup> Biomedical Center, Medical Faculty of Charles University, Pilsen, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Clinical Biochemistry and Hematology, University Hospital, Pilsen, Czech Republic

<sup>4</sup> Centre for Cardiovascular Prevention of the First Faculty of Medicine, Charles University and Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic

arise from nonenzymatic reactions between reducing sugars and biological proteins or lipids [8, 9]. AGEs have pathological significance in several chronic diseases, such as diabetes, chronic renal failure, and atherosclerosis [8, 10–12]. AGEs potentiate multiple microvascular and macrovascular complications by interacting with a specific cellular receptor (or binding motif) for AGEs (the RAGE) that is expressed on multiple cell types: smooth muscle cells, endothelial cells, cardiomyocytes, epithelial cells, etc. [11, 13]. This interaction culminates in the cross-linking of collagen fibers, which leads to higher resistance of collagen to enzymatic proteolysis and increases relative collagen content in the arterial wall; this manifests clinically as increased arterial stiffness (PWV) [14, 15].

The soluble isoform of RAGE (sRAGE) is cleaved from the cell surface by matrix metalloproteinases. This isoform is present in blood, where it captures circulating AGEs and thus has a protective role against AGE/RAGE-mediated pathophysiological processes (including the above-mentioned cross-linking of collagen). It has been shown that mice treated with sRAGE suppressed diabetes-associated acceleration of atherosclerosis independently of glycemic or lipid status [16, 17].

In humans, low plasma levels of sRAGE have been associated with increased risk of coronary artery disease (CAD) and progression of atherosclerosis in subjects with or without manifest diabetes; low levels have also been found in patients with calcified aortic valve stenosis [18, 19]. In our previous study, low circulating sRAGE was also independently associated with increased stiffness of central arteries in the general population [20]. In contrast, high levels of sRAGE in nondiabetic men were associated with a lower incidence of CAD [21]. To our knowledge, no previous paper has investigated the relationship between sRAGE and age-related stiffening of large arteries in a prospective design. In the present analysis, we investigated the role of circulating sRAGE concentration on the individual age-dependent change in aortic PWV over a period of ~8 years in a general population-based sample.

## Methods

All procedures performed in this study were in accordance with the principles of Good Clinical Practice and ethical standards formulated in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. The study protocol was approved by the local Ethics Committee of the University Hospital in Pilsen. Written informed consent was obtained from all participants included in the study. Data were stored and evaluated under the provisions of the Czech Data Protection Act and GDPR direction of the European Committee.

## Design and study population

The analysis represents a prospective cohort study of a general population-based sample.

The initial study cohort consisted of 1103 individuals examined as a part of the Czech post-MONICA study in 2008. A random 1% sample of Pilsen region residents aged 25–75 years was selected from General Health Insurance Registry; all details are reported elsewhere [20, 22]. From this cohort, 115 subjects moved, 87 died, so 901 individuals were invited for clinical follow-up examination.

A total of 632 subjects responded to our invitation (70.1% of the invited sample) and attended the examination program, but data from PWV measurements were unavailable (imprecise or invalid measurements because of arrhythmia or body constitution) in 102 individuals, and they had to be excluded from the analysis. The total analyzed population thus consisted of 530 subjects in whom two PWV measurements ~8 years apart were available (i.e., from the baseline examination in 2008 and from the follow-up visit in 2016/17).

## Clinical examination and laboratory analysis

We obtained information on each subject's personal characteristics, personal and family history of CAD, lifestyle (smoking, drinking, exercise habits, etc.), and pharmacotherapy. Height and weight were measured using a SECA 767 (SECA GmbH & Co, Hamburg, Germany) scale with a telescopic measuring rod. Body mass index (BMI) was calculated as body weight (kg)/height<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>). Blood pressure (BP) was measured using the auscultatory technique and an appropriately sized cuff. Measurements were performed three times in the sitting position on the right arm, and the average BP was determined by the average of the second and third measurements. The mean arterial pressure was calculated as one-third of systolic pressure plus two-thirds of diastolic pressure.

Properties of large arteries were measured based on a 2006 Expert Consensus Document [23]. Arterial measurements were obtained after 15 min of rest in the supine position in a quiet room using a SphygmoCor MM3 device (AtCor Medical Ltd, Sydney, NSW, Australia). Aortic PWV was measured between carotid and femoral arteries. It was calibrated by measuring BP on the contralateral arm before the recordings. The distance between the carotid pulsation and jugular fossa and between the jugular fossa and femoral recording site was measured on the body surface. The travel distance along the aorta was calculated by subtracting these two distances. Registrations of the pulse waves were ECG-gated so we could calculate the time shift between the appearance of the wave at the first and second sites. PWV was calculated as the ratio of the travel distance



(m) and the transit time (s), and the average of two recordings was used for analysis. Two recordings were usually performed, but another recording was done if the difference between recordings was  $>0.5$  m/s.

Venous blood samples were drawn after at least 12 h of fasting, and all laboratory examinations were realized in series from aliquots stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . We assessed the total and HDL cholesterol, triglyceride, serum creatinine, and glucose levels from serum samples using a Cobas Mira/ROCHE analyzer (ROCHE Diagnostics, Basel, Switzerland) and commercially available kits of the same company. LDL cholesterol was calculated using the Friedewald equation, i.e.,  $\text{LDL} = \text{total cholesterol} - \text{HDL} - (\text{TG}/2.22)$ . The concentration of the soluble form of the receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) was quantified by ELISA using a Human RAGE Quantikine ELISA Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA).

### Data analysis

For database management and statistical analyses, SAS software version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used. Data are presented as median and interquartile range (because of nonnormality of most variables) or by relative frequencies (for categorized variables). The intraindividual difference in aortic PWV (follow-up minus baseline value) was divided by the exact time between these two visits, and the parameter obtained ( $\Delta\text{PWV}/\text{year}$ , i.e., individual change in PWV per year of follow-up) was used as the primary estimate of individual age-dependent arterial stiffening.

Risk factors were dichotomized into binary variables with limits based on the 6th European Guidelines for Cardiovascular prevention [24]. Overt diabetes was defined as fasting glucose  $\geq 7.0$  mmol/L and/or use of antidiabetic medication.

Hypertension was defined as systolic BP  $\geq 140$  mmHg and/or diastolic BP  $\geq 90$  mmHg and/or treatment with anti-hypertensive medication. Accelerated arterial stiffening was arbitrary set as  $\Delta\text{PWV}/\text{year} \geq 0.2$  m/s (which is roughly the median of individual  $\Delta\text{PWV}/\text{year}$  in our sample and an approximately twofold higher increase than the expected “natural” progression, i.e., 1 m/s per age decade [5, 25]). Concentrations of sRAGE were divided into quintiles as follows:  $<890$ , 890–1126, 1127–1400, 1401–1694, and  $\geq 1695$  pg/ml. Only conventional statistical methods were applied. The Wilcoxon sign-rank (paired) test was used to compare baseline and follow-up values. The association between  $\Delta\text{PWV}/\text{year}$  and its potential covariates was evaluated by Spearman’s correlation, and then by multivariate linear and logistic regression. Power calculations revealed that our population of subjects was sufficiently large to detect differences in the primary estimate ( $\Delta\text{PWV}/\text{year}$ ) with a 5% relative precision level. Statistical significance was considered present at a  $P$  value of 0.05.

## Results

### Characteristics of participants

The study cohort consisted of 530 subjects, 291 females and 239 males with a median follow-up of 8.0 years (interquartile range 7.6–9.2). Detailed baseline and follow-up characteristics are given in Table 1. The average intraindividual increase in PWV was 1.49 m/s, giving 0.18 m/s/year  $\Delta\text{PWV}/\text{year}$ . The concentration of sRAGE decreased significantly during the same time. The median differences between baseline and follow-up visits in other factors can be seen in the 3rd column of Table 1.

In comparison with the baseline values, the number of active smokers decreased, while BMI, waist circumference, systolic BP, prevalence of hypertension, and overt diabetes increased, during follow-up. Prescription rates of relevant pharmacotherapy increased equivalently.

### Baseline sRAGE and its covariates

Univariate associations between baseline sRAGE and other clinical parameters can be seen in Table 2. Spearman’s coefficient was used to measure correlations.

Using sRAGE as a reference variable, it was significantly negatively correlated with age, BMI, waist circumference, MAP, fasting glycemia, serum creatinine and aortic PWV measurements (baseline and  $\Delta\text{PWV}/\text{year}$ ).

The differences in the same parameters between the upper and lower sRAGE quintiles were also calculated and can be seen in the right part of Table 2. Mean age, BMI, waist circumference, MAP, fasting glycemia, and PWV measurements were significantly higher in the bottom quintile than in the top quintile. A significantly lower baseline sRAGE concentration was found in males [1195 vs. 1432 pg/mL in females;  $p < 0.0001$  (Wilcoxon sum-rank test)], patients with arterial hypertension [1216 vs. 1403 pg/mL in nonhypertensives;  $p < 0.0001$ ] and subjects using antihypertensive medication [1204 vs. 1374 pg/mL;  $p = 0.0003$ ]. In contrast, there was no significant difference between subjects with a history of vascular disease vs. those without [1243 vs. 1330 pg/mL;  $p = 0.642$ ], diabetics vs. nondiabetics [1170 vs. 1332 pg/mL;  $p = 0.195$ ], smokers vs. nonsmokers [1378 vs. 1302 pg/mL;  $p = 0.219$ ], or subjects using vs. not using statin medication [1333 vs. 1272 pg/mL;  $p = 0.480$ ]; not shown in the table.

### sRAGE and accelerated arterial stiffening

Mean intraindividual differences in PWV during follow-up ( $\Delta\text{PWV}/\text{year}$ ) significantly decreased across sRAGE quintiles (Fig. 1). In the same semicontinuous manner, a decrease by one sRAGE quintile was associated with a



**Table 1** Baseline characteristics of study sample ( $n = 530$ ) [median (interquartile range) or factor proportion]

	Baseline	Follow-up	Difference	$p$
Age [years]	55.4 (44.3–64.5)	63.2 (52.3–73.5)	8.0 (7.6–9.2)	$p < 0.001$
Gender [% of males]	45.1	45.1	–	–
History of vascular disease <sup>a</sup> [%]	5.5	11.1	5.7	$p < 0.001$
Current smoking [%]	30.6	19.2	–11.3	$p < 0.001$
Body mass index [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ]	26.6 (23.6–29.8)	27.2 (24.3–30.6)	0.7 (–0.4–2.0)	$p < 0.001$
Waist circumference [cm]	93.0 (83.0–101.0)	97.0 (87.0–106.0)	5.0 (0.0–9.0)	$p < 0.001$
Systolic blood pressure [mmHg]	126.0 (116.0–136.7)	131.8 (121.5–144.0)	6.3 (–4.3–16.2)	$p < 0.001$
Diastolic blood pressure [mmHg]	80.7 (74.7–86.0)	80.3 (75.0–87.0)	0.0 (–6.0–6.3)	0.973
Mean arterial pressure	95.6 (89.6–103.3)	98.3 (92.0–105.7)	2.3 (–4.8–9.3)	$p < 0.001$
Hypertension <sup>b</sup> [%]	41.7	63.2	21.5	$p < 0.001$
Tx/w ACEi or ARBs [%]	18.7	23.2	4.5	0.027
Tx/w antihypertensives [%]	28.7	45.5	16.8	$p < 0.001$
Total cholesterol [mmol/L]	5.20 (4.56–5.76)	5.11 (4.50–5.83)	0.12 (–0.51–0.65)	0.093
HDL cholesterol [mmol/L]	1.45 (1.19–1.73)	1.57 (1.27–1.88)	0.11 (–0.03–0.29)	$p < 0.001$
LDL cholesterol [mmol/L]	3.10 (2.50–3.62)	2.88 (2.34–3.56)	–0.01 (–0.61–0.44)	0.107
Triglycerides [mmol/L]	1.18 (0.85–1.67)	1.16 (0.85–1.67)	0.02 (–0.29–0.30)	0.933
Tx/w statins [%]	12.8	25.8	13.0	$p < 0.001$
Fasting glycaemia [mmol/L]	5.10 (4.80–5.50)	5.10 (4.80–5.60)	0.10 (–0.30–0.40)	0.004
Tx/w antidiabetics [%]	1.9	8.9	7.0	$p < 0.001$
Overt diabetes <sup>c</sup> [%]	4.2	10.4	6.2	$p < 0.001$
Serum creatinine [ $\mu\text{mol}/\text{L}$ ]	76.8 (68.75–86.0)	75.00 (66.00–84.00)	–2.25 (–8.60–4.70)	$p < 0.001$
sRAGE [pg/mL]	1271 (952–1622)	990 (761–1338)	–209 (–463–12)	$p < 0.001$
Aortic pulse wave velocity [m/s]	7.30 (6.10–8.70)	8.58 (7.45–10.25)	1.33 (0.45–2.55)	$p < 0.001$

$p$  calculated using Wilcoxon sign-rank (paired) test or McNemar's test (for binomial variables)

Tx/w treatment with..., ACEi angiotensin-converting enzyme inhibitors, ARBs angiotensin II receptor blockers, HDL high density lipoprotein, LDL low density lipoprotein, sRAGE soluble receptor for advanced glycation end-products

<sup>a</sup>History of myocardial infarction, ischemic stroke, peripheral vascular disease or atherosclerosis in other localization, including all revascularization procedures

<sup>b</sup>Systolic blood pressure  $\geq 140$  and/or diastolic blood pressure  $\geq 90$  mmHg and/or antihypertensive treatment

<sup>c</sup>Fasting glycaemia  $\geq 7$  mmol/L and/or treatment with antidiabetics

**Table 2** Univariate association of baseline sRAGE and its potential covariates in continuous manner (Spearman's correlation) and by differences in these factors between bottom and top quintile of sRAGE

	Spearman's $R$	$p$ value	Low sRAGE <sup>a</sup>	High sRAGE <sup>b</sup>	$p$ value <sup>c</sup>
Age	–0.218	$< 0.0001$	56.6 (11.1)	50.2 (12.9)	$< 0.0001$
Body mass index	–0.333	$< 0.0001$	28.5 (4.3)	24.8 (3.9)	$< 0.0001$
Waist circumference	–0.355	$< 0.0001$	98.2 (11.9)	85.6 (11.84)	$< 0.0001$
Mean arterial pressure	–0.190	$< 0.0001$	98.7 (10.6)	92.7 (9.0)	$< 0.0001$
LDL cholesterol	–0.031	0.4788	3.14 (0.87)	3.06 (0.85)	0.4775
HDL cholesterol	0.085	0.0517	1.42 (0.33)	1.51 (0.39)	0.0927
Triglycerides	–0.144	0.0009	1.52 (0.87)	1.21 (0.59)	0.0089
Fasting glycaemia	–0.236	$< 0.0001$	5.39 (0.68)	5.05 (0.69)	$< 0.0001$
Serum creatinine	–0.135	0.0019	80.8 (13.8)	76.0 (12.0)	0.0065
Aortic PWV at baseline	–0.123	0.0046	7.8 (2.1)	7.1 (1.8)	0.0046
$\Delta$ aPWV/year	–0.195	$< 0.0001$	0.23 (0.23)	0.13 (0.21)	$< 0.0001$

PWV pulse wave velocity,  $\Delta$ PWV/year, PWV at follow-up minus PWV at baseline visit divided by exact time between these two visits; (baseline values of each variable were used, otherwise stated else)

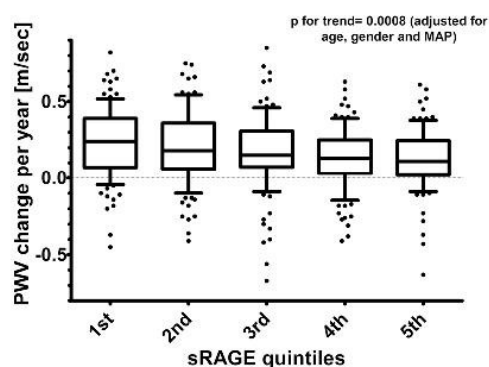
<sup>a</sup>Bottom quintile, i.e.,  $< 890$  pg/mL

<sup>b</sup>Top quintile, i.e.,  $\geq 1695$  pg/mL

<sup>c</sup> $p$  by Mann-Whitney U test

20.9% increase in the risk (95% CI: 1.075–1.413) of the arbitrary set “accelerated arterial stiffening” ( $\Delta$ PWV/year  $\geq$  0.2 m/s),  $p = 0.0036$ , adjusted for age; sex; BMI; MAP; treatment with antihypertensives, statins or antidiabetics; serum glucose; and baseline PWV; not shown in the tables.

Multivariate linear regression analysis (all possible covariates and subsequent step-wise model) for  $\Delta$ PWV/year as the dependent continuous variable can be seen in Table 3. Subsequent exploratory analysis using baseline systolic BP instead of MAP was performed producing almost identical results; not shown in the table. Age, male sex, and treatment with antidiabetic medication were associated with an increase in  $\Delta$ PWV/year, while sRAGE was associated with a lower  $\Delta$ PWV/year increase. This association remained significant after logarithmic transformation of sRAGE (with  $\beta = -0.081$



**Fig. 1** Difference in aortic pulse wave velocity per year by sRAGE quintile (box-and-whisker plots) [ $p$  value adjusted for age, sex, and mean arterial pressure (MAP); limits of sRAGE quintiles are as follows: <890, 890–1126, 1127–1400, 1401–1694, and  $\geq$ 1695 pg/ml]

**Table 3** Multivariate association between standardized individual increase of aortic pulse wave velocity during follow-up (dPWV per year) and its potential covariates

	All variables included		Step-wise model	
	$\beta$ coeff. (standard error)	$p$ value	$\beta$ coeff. (standard error)	$p$ value
Age	0.00731 (0.00088)	<0.0001	0.00752 (0.00085)	<0.0001
Gender	0.03842 (0.02145)	0.0739	0.04737 (0.01766)	0.0075
History of vascular disease	-0.00365 (0.04041)	0.9281	Not entered	
Current smoking	0.00939 (0.01907)	0.6225	Not entered	
Body mass index	0.00266 (0.00228)	0.2445	Not entered	
Mean arterial pressure	0.00022 (0.00097)	0.8223	Not entered	
Treatment with antihypertensives	0.02918 (0.02205)	0.1863	0.03971 (0.02064)	0.055
Total cholesterol	0.00422 (0.01014)	0.6776	Not entered	
Triglycerides	-0.00639 (0.01152)	0.5794	Not entered	
Treatment with statins	0.02125 (0.02903)	0.4644	Not entered	
Fasting glucose	0.00422 (0.01259)	0.7379	Not entered	
Treatment with antidiabetics	0.29629 (0.06817)	<0.0001	0.31000 (0.06453)	<0.0001
Serum creatinine	0.00059 (0.00078)	0.4535	Not entered	
Aortic PWV (baseline)	-0.07825 (0.00531)	<0.0001	-0.07716 (0.00502)	<0.0001
sRAGE	-0.000056 (0.000019)	0.0028	-0.000060 (0.000018)	0.0007

Multiple linear regression with  $\Delta$ PWV/year [m/s] as dependent variable (baseline values were used)

( $\pm$ SE 0.023),  $p = 0.0003$ ). We also performed a series of exploratory analyses to exclude the potential influence of prescribed medication. The primary association between baseline sRAGE and  $\Delta$ PWV/year remained uninfluenced either by medication reported at baseline or at the follow-up visit (we focused on all classes of antihypertensives, lipid-lowering drugs, or antidiabetics). Moreover, it remained significant even if the multivariate regression analysis was performed only with subjects virtually without any reported chronic medication; not shown in the tables.

Multiple step-wise logistic regression models were used afterwards to identify predictors of accelerated arterial stiffening (Table 4, first panel) in a categorized manner.

Low sRAGE (<890 pg/mL) remained significantly associated with accelerated arterial stiffening ( $\Delta$ PWV/year  $\geq$  0.2 m/s) even after complex adjustment for other clinical parameters (and also baseline PWV) as potential covariates. An inverse association was observed when high sRAGE ( $\geq$ 1695 pg/mL) was used in a similar model. Confirmatory results were obtained in a separate analysis when diabetic subjects were excluded (22 participants); Table 2, 2nd panel. Furthermore, when analyzing separately younger and older populations (dichotomized around age 60), low sRAGE significantly positively predicted accelerated arterial stiffening (and vice versa high sRAGE negatively) in subjects younger than 60 years (3rd panel of Table 4) but not the older ones [not in table; the corresponding odds ratio (OR) for low sRAGE was 0.962 (95% CI: 0.447–2.074),  $p = 0.922$ , while for high sRAGE it was 0.535 (95% CI: 0.198–1.447),  $p = 0.218$ ].

The effect of concomitant hypertension was analyzed in the last step. Neither low nor high sRAGE showed a

**Table 4** Predictors of accelerated age-dependent arterial stiffening ( $\Delta$ PWV/year  $\geq$  0.2 m/s)

	All subjects ( $n = 530$ )		Model B (high sRAGE vs. rest)	
	Odds ratio (95% conf. intervals)	$p$ value	Odds ratio (95% conf. intervals)	$p$ value
Age	1.06 (1.04–1.08)	<0.0001	1.06 (1.04–1.08)	<0.0001
BMI	1.04 (0.99–1.09)	0.067	1.04 (0.99–1.09)	0.094
Treatment with antidiabetics	7.23 (1.37–38.27)	0.020	7.78 (1.52–39.87)	0.014
Serum creatinine	1.02 (1.01–1.04)	0.003	1.02 (1.01–1.04)	0.002
PWV at baseline	0.59 (0.51–0.68)	<0.0001	0.58 (0.50–0.67)	<0.0001
Low sRAGE <sup>a</sup>	1.72 (1.06–2.79)	0.028	–	–
High sRAGE <sup>b</sup>	–	–	0.55 (0.33–0.90)	0.017
Nondiabetic subjects ( $n = 508$ )				
Age	1.06 (1.04–1.09)	<0.0001	1.06 (1.04–1.09)	<0.0001
BMI	1.07 (1.02–1.12)	0.009	1.06 (1.01–1.12)	0.013
Serum creatinine	1.02 (1.01–1.04)	0.004	1.02 (1.01–1.04)	0.003
PWV at baseline	0.57 (0.49–0.66)	<0.0001	0.56 (0.48–0.66)	<0.0001
Low sRAGE <sup>a</sup>	1.84 (1.12–3.04)	0.017	–	–
High sRAGE <sup>b</sup>	–	–	0.55 (0.33–0.92)	0.023
Nondiabetic subject younger than 60 ( $n = 322$ )				
Age	1.05 (1.02–1.09)	0.004	1.05 (1.02–1.09)	0.003
BMI	1.06 (1.00–1.13)	0.048	1.06 (1.00–1.13)	0.060
Total cholesterol	1.33 (1.00–1.75)	0.046	1.30 (0.99–1.70)	0.062
Serum creatinine	1.03 (1.01–1.06)	0.004	1.04 (1.01–1.06)	0.002
PWV at baseline	0.52 (0.41–0.66)	<0.0001	0.53 (0.42–0.66)	<0.0001
Low sRAGE <sup>a</sup>	2.79 (1.42–5.47)	0.003	–	–
High sRAGE <sup>b</sup>	–	–	0.51 (0.28–0.95)	0.032
Nondiabetic, normotensive subjects younger than 60 ( $n = 229$ )				
Age	1.05 (1.01–1.10)	0.013	1.05 (1.01–1.10)	0.010
Gender	2.30 (1.21–4.36)	0.011	2.47 (1.32–4.63)	0.005
BMI	1.08 (0.99–1.17)	0.072	1.08 (0.99–1.17)	0.075
Total cholesterol	1.63 (1.14–2.32)	0.007	1.59 (1.12–2.26)	0.010
PWV at baseline	0.40 (0.28–0.57)	<0.0001	0.40 (0.28–0.57)	<0.0001
Low sRAGE <sup>a</sup>	3.19 (1.27–8.01)	0.014	–	–
High sRAGE <sup>b</sup>	–	–	0.64 (0.32–1.28)	0.206

Multiple step-wise logistic regression,  $\Delta$ PWV/year  $\geq$  0.2 m/s was used as dependent variable; following covariates were initially included into full model: age, male gender, history of vascular disease, BMI, mean arterial pressure, treatment with antihypertensives, serum cholesterol, serum triglycerides, treatment with statin, serum glucose, treatment with antidiabetics, serum creatinine, and PWV (baseline values were used)

<sup>a</sup>Bottom quintile, i.e., <890 pg/mL

<sup>b</sup>Top quintile, i.e.,  $\geq$ 1695 pg/mL

significant association with  $\Delta$ PWV/year  $\geq$  0.2 m/s in hypertensive subjects (with or without diabetes). In normotensive participants, low and high sRAGE showed only borderline significant associations [OR for low sRAGE was 1.997 (95% confidence interval (CI): 0.986–4.044);  $p = 0.0546$ ; OR for high sRAGE 0.578 (95% CI: 0.313–1.067);  $p = 0.0797$ ]. However, if only normotensives younger than 60 years were analyzed, the relative power of the association between  $\Delta$ PWV/year  $\geq$  0.2 m/s and low sRAGE substantially increased [OR 3.500 (95% CI: 1.417–8.648),

$p = 0.0066$ ]. When all hypertensive, diabetic and  $\geq$ 60-year-old subjects were excluded, the association between  $\Delta$ PWV/year  $\geq$  0.2 m/s and low sRAGE remained, but high sRAGE became insignificant (last panel of Table 4).

## Discussion

The key finding of our study is that the status of circulating sRAGE probably substantially influenced the natural course



of vascular aging, as quantified by individual age-dependent increases in arterial stiffness (PWV). Baseline serum sRAGE concentration was significantly associated with an individual increase in aortic PWV, even when adjusted for other major covariates (pathophysiological factors of arterial stiffening). Moreover, subjects with a low status of sRAGE demonstrated accelerated individual increases in aortic PWV, and conversely, those with a high status at the baseline lower course of age-dependent stiffening. The difference in the individual increase of aortic PWV during follow-up was  $\sim 0.1$  m/s per year or  $\sim 1$  m/s per age decade between the most extreme groups of sRAGE (i.e., the observed  $\Delta$ PWV/year was 0.13 and 0.23 m/s in the 1st and 5th quintiles, respectively). It is generally accepted that the “natural course” of vascular aging is consistent with the increase in PWV by 1 m/s per age decade [25]. Therefore, the general message of our study can be simplified as the low circulating status of sRAGE “added” another 10 years on average to the natural course of vascular aging when compared with high sRAGE concentrations. Alternatively, the relative risk (OR) of having PWV twofold “faster” than expected (i.e., 0.2 m/s per year = 2 m/s per age decade) was higher in low sRAGE subjects by 72%, while in those with high circulating sRAGE at baseline lower by 45% (both statistically significant even after adjustment for other major covariates of individual PWV).

The mean individual increase in PWV/year was unexpectedly high in our sample (0.18 m/s). We can only hypothesize a possible reason for this phenomenon. Our sample was based on a general sample population of Czech residents. The population of postcommunist Eastern and Central European countries is known to be at a higher risk of cardiovascular disease mainly because of adverse lifestyle factors [22, 26]. The average age in our sample at baseline was 54 years, and the stiffening of arteries accelerates with aging. Indeed, an exploratory analysis of average  $\Delta$ PWV/year by age decade was performed on our sample and showed that while the mean increase of PWV per year was 0.15 m/s both in the 2nd and 3rd decades, it was 0.21 m/s in the 6th and 0.28 m/s in the 7th decade. This could partially explain the higher-than-expected (i.e., 0.1 m/s) increase in aPWV.

However, our conclusions are consistent not only with the presumed physiological properties of circulating sRAGE (as mentioned in the “Introduction” section) but also with several previously reported retrospective studies, mainly in the setting of hypertensive patients. In our previous cross-sectional analysis, we found that nondiabetic hypertensive patients with low circulating sRAGE ( $<918$  pg/mL) showed significantly increased aortic PWV compared with those with higher sRAGE [20]. Dimitriadis et al. [27] demonstrated an inverse association between sRAGE and aortic PWV, while Geroldi et al. [28] demonstrated an

inverse association between sRAGE and pulse pressure (also a phenotype of individual arterial stiffness). The available data are also supportive of the opposite point of view, i.e., an association of PWV and AGEs (a real pathophysiological factor). McNulty et al. [29] reported that there was a positive association between plasma concentration of one AGE (carboxymethyl lysine) in hypertensive patients, and a similar association was found in older subjects in another general population-based cross-sectional analysis [30].

Although the association between baseline sRAGE status and individual dynamics of arterial stiffening was generally independent from potential covariates, it was not completely homogenous across the full sample. First, age itself is by far the most important predictor of individual arterial stiffness [25]. On the other hand, in the interaction analysis, we observed that low sRAGE status markedly accelerated the age-dependent PWV increase in younger subjects (aged  $<60$  years at baseline), but none or very marginally in those aged  $\geq 60$  years. It is a plausible explanation for the observed discrepancy. Like other somatic properties, arterial stiffness has a ceiling physiological value, and older subjects with very high primary arterial stiffness cannot further increase their PWV too much in absolute value, irrespective of other factors. In contrast, younger subjects had primary lower arterial stiffness, and those with low sRAGE status at baseline were especially prone to individually accelerated PWV increase. Younger subjects with low sRAGE status had more than 3 times higher risk of having an individual increase in PWV  $\geq 0.2$  m/s per year, but this association completely disappeared in those aged 60 years and over. The reason is probably that these subjects reached the “end-stage” PWV sooner (i.e., at a younger age). We have a similar explanation for other paradoxical findings, i.e., the inverse association between PWV at baseline and its individual increase during follow-up (see Table 4): that the theoretical possible increase is, in already high-PWV subjects, paradoxically lower than in low-PWV subjects.

The situation is complicated in diabetic subjects. Circulating sRAGE is generally lower in patients with impaired glucose metabolism [31], probably reflecting its increased consumption in subjects with enhanced formation of AGEs. This phenomenon was also observed in our data, though it was not significant (1170 vs. 1332 pg/mL in nondiabetics  $p = 0.195$ ). Generally, data on the association between sRAGE or AGEs and PWV in diabetic subjects are very rare, and we found only one (very small and cross-sectional) study analyzing this relationship in patients with overt diabetes. Surprisingly, that study suggested that there is an inverse association between sRAGE and arterial stiffness in patients with hypertension without diabetes, but a positive correlation in hypertensive patients with diabetes ( $n = 107$ ) [32]. In the present study, the association between low



sRAGE status and accelerated stiffening over time also remained if subjects with overt diabetes at baseline were excluded from the analysis (Table 4). However, due to the low frequency of diabetic patients in our sample (only 22 subjects), we were not able to verify a similar association on the background of overt diabetes.

A possible effect of background hypertension was also tested because available data from cross-sectional studies are almost exclusively based on hypertensive patients [20, 27–29]. In normotensive participants, low sRAGE showed only a borderline significant association with accelerated stiffening. However, this association appeared again when only younger participants (baseline age < 60 years) were analyzed. Thus, the presence of hypertension probably did not substantially influence the association between sRAGE status and dynamics of arterial stiffening.

It is also necessary to stress that several studies have identified high sRAGE as a mortality indicator (i.e., contrary to its presumed protective mechanism) [33–38]. However, these studies were generally done in severely ill patients and/or in acute situations (heart failure, hemodialysis, septic shock, acute respiratory distress syndrome, and acute coronary syndrome (ACS)). We can speculate that an increase in sRAGE represents a different pathophysiologic process in these acute situations (probably acute response to stress) than in long-term stable and generally healthy subjects. A recent paper by Grauen Larsen et al. [37] supports this hypothesis. Their study was done in patients after ACS and found a dual association between sRAGE and the risk of recurrent major cardiovascular events (MACE). The concentration of sRAGE estimated within 24 h after ACS was positively associated with MACE incidence, while a virtually inverse relation was found for concentration estimated at week 6. Similarly discrepant findings are also reported between acute and chronic stable coronary heart disease [39]. Moreover, a large prospective study examining 4612 general population-based subjects reported that high sRAGE was associated with decreased risk of MACE, mortality and slower progression of intima–media thickness (i.e., in line with our observations) [40]. Therefore, for the general interpretation of sRAGE as a biomarker of cardiovascular risk, the background condition of its estimation (acute or stable subjects, coincident advanced disease, etc.) should also be taken into account.

Indeed, sRAGE is not the only available estimate of the RAGE-AGE axis. A recent paper by Prasad [41] proposed the AGE-to-sRAGE ratio as the most appropriate universal biomarker in this field; another indicator (with slightly different biological function) is endogenous secretory RAGE (esRAGE). Unfortunately, we have no data about these parameters at the baseline visit, and therefore, we are not able to decide which one is the best predictor of

individual progression of arterial stiffness. However, we analyzed some of these additional variables at the final visit and tested exploratory the relation of these parameters to individual changes in PWV in the previous ~8 years (i.e., with “reverse logic”). We found an independent association (in a multivariate model similar to the regression in Table 3) between  $\Delta$ PWV/year and sRAGE (at the final visit) again, but not with an AGE (carboxymethyl lysine, CML) or the CML-to-sRAGE ratio. Therefore, sRAGE seems to be a more appropriate predictor of vascular aging, at least in our series.

Only interventional studies can finally answer the question whether any factor (in our case low sRAGE status) is causative (and not an “innocent bystander”) and whether its therapeutic manipulation leads to any benefit in terms of human health. Several drug classes (statins, angiotensin-converting enzyme inhibitors, glitazone-type antidiabetics,) increase serum sRAGE in animal models or even in humans [42–44], but their potential benefit via sRAGE can be hardly substantiated from their primary therapeutic effects (lowering cholesterol, BP, etc.). In theory, exogenous administration of recombinant sRAGE is available, but until now, its effect was studied only in animal models [45–47]. A potentially very promising drug was alagebrium, which nonenzymatically breaks the cross-links between collagen fibers caused by AGEs; it was the only drug tested on a clinical scale that directly targeted arterial stiffness. However, after few smaller clinical studies with more rather than less positive findings in terms of reduction of arterial stiffness [48–50], its clinical testing was halted, from the best available information, mainly for economic reasons. Thus, despite being very promising in theory, the therapeutic concept targeting prophylaxis of AGE deposition in vessel walls is still waiting verification.

### Study limitations

First, as the main indicator of sRAGE status, we used its baseline value only. It cannot be completely excluded that this factor may intraindividually vary over time, for example, seasonally or according to the immediate status of glucose metabolism (to our knowledge, no study has addressed this question). Moreover, our study cohort is based on a random population sample, but as in other surveys, we strongly depend on the willingness of volunteers to attend the examination program (in our case, twice). It is well known that this kind of survey is attended paradoxically by a relatively healthier part of the population. Therefore, our results are not fully generalizable, in particular to more vascular-affected individuals.

We also have no data about sRAGE ligands, such as CML or HMGB<sub>1</sub> (high-mobility-group box 1), at the baseline visit.

## Conclusions

A low status of circulating sRAGE at baseline was associated in the middle-aged general population with a gradually accelerated age-dependent increase in aortic PWV, while a high status acted protectively in this direction. A plausible explanation of this phenomenon is that circulating sRAGE slowed the deposition of AGEs in the vessel wall, and then decreased the age-dependent stiffening of large arteries (as the most common phenotype of vascular aging). Therefore, further research in the direction of possible therapeutic interventions for sRAGE or AGEs seems to be highly warranted. To our knowledge, our analysis demonstrated the importance of circulating sRAGE status on progressive arterial stiffening for the first time in a prospective cohort study.

**Acknowledgements** The study was supported by the Health Development Agency of the Czech Ministry of Health (project 15-27109) and by the Charles University Research Fund (PROGRES, project Q39). We would like to acknowledge the hard work of all investigators and other coworkers (study nurses, laboratory technicians, and medical students) who participated in the post-MONICA project, and last but not least all study subjects, who voluntarily participate in the very time-consuming clinical examination program.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## References

- O'Rourke MF, Mancia G. Arterial stiffness. *J Hypertens*. 1999;17:1–4.
- Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, Moreau P. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc Res*. 2005;66:307–17.
- Robert L. Aging of the vascular-wall and atherosclerosis. *Exp Gerontol*. 1999;34:491–501.
- Folkow B, Svanborg A. Physiology of cardiovascular aging. *Physiol Rev*. 1993;73:725–64.
- Collaboration TRVfAS. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *Eur Heart J*. 2010;31:2338–50.
- Cecelja M, Chowienczyk P. Dissociation of aortic pulse wave velocity with risk factors for cardiovascular disease other than hypertension: a systematic review. *Hypertension*. 2009;54:1328–36.
- McEniery CM, Yasmin, Hall IR, Qasem A, Wilkinson IB, Cockcroft JR. Normal vascular aging: differential effects on wave reflection and aortic pulse wave velocity: the Anglo-Cardiff Collaborative Trial (ACCT). *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1753–60.
- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114:597–605.
- Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Investig*. 1997;99:457–68.
- Kalousova M, Zima T, Tesar V, Dusilova-Sulkova S, Skrha J. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. *Mutat Res*. 2005;579:37–46.
- Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*. 2008;196:9–21.
- Georgianos PI, Pikilidou MI, Liakopoulos V, Balaskas EV, Zebekakis PE. Arterial stiffness in end-stage renal disease-pathogenesis, clinical epidemiology, and therapeutic potentials. *Hypertens Res*. 2018;41:309–19.
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YCE, et al. Cloning and expression of a cell-surface receptor for advanced glycosylation end-products of proteins. *J Biol Chem*. 1992;267:14998–5004.
- Schneider SL, Kohn RR. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glycosylation of human skin collagen. *J Clin Investig*. 1981;67:1630–5.
- Vasan S, Zhang X, Kapurniotu A, Bemhagen J, Teichberg S, Basgen J, et al. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature*. 1996;382:275–8.
- Koyama H, Yamamoto H, Nishizawa Y. RAGE and soluble RAGE: potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Mol Med*. 2007;13:625–35.
- Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran JrLJ, Chow WS, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med*. 1998;4:1025.
- Basta G, Corciu AI, Vianello A, Del Turco S, Foffa I, Navarra T, et al. Circulating soluble receptor for advanced glycation end-product levels are decreased in patients with calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis*. 2010;210:614–8.
- Koyama H, Shoji T, Yokoyama H, Motoyama K, Mori K, Fukumoto S, et al. Plasma level of endogenous secretory RAGE is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2587–93.
- Mayer O, Seidlerova J, Filipovsky J, Vagovicova P, Wohlfahrt P, Cifkova R, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products and increased aortic stiffness in the general population. *Hypertens Res*. 2016;39:266–71.
- Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Buzzi MP, Belvito C, Cuccia M, et al. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1032–7.
- Cifkova R, Skodova Z, Bruthans J, Adamkova V, Jozifova M, Galovcova M, et al. Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. Czech MONICA and Czech post-MONICA. *Atherosclerosis*. 2010;211:676–81.
- Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006;27:2588–605.
- Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed



- with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis*. 2016;252:207–74.
25. Herbert A, Cruickshank JK, Laurent S, Boutouyrie P. Establishing reference values for central blood pressure and its amplification in a general healthy population and according to cardiovascular risk factors. *Eur Heart J*. 2014;35:3122–33.
  26. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J*. 2014;35:2950–9.
  27. Dimitriadis K, Tsioufis C, Kasiakogias A, Miliou A, Poulakis M, Kintis K, et al. Soluble receptor for advanced glycation end-product levels are related to albuminuria and arterial stiffness in essential hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013;23:382–8.
  28. Geroldi D, Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Calcagnino M, Buzzi MP, et al. Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end-products in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 2005;23:1725–9.
  29. McNulty M, Mahmud A, Feely J. Advanced glycation end-products and arterial stiffness in hypertension. *Am J Hypertens*. 2007;20:242–7.
  30. Semba RD, Najjar SS, Sun K, Lakatta EG, Ferrucci L. Serum carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, is associated with increased aortic pulse wave velocity in adults. *Am J Hypertens*. 2009;22:74–9.
  31. Miranda ER, Somal VS, Mey JT, Blackburn BK, Wang E, Farabi S, et al. Circulating soluble RAGE isoforms are attenuated in obese, impaired-glucose-tolerant individuals and are associated with the development of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2017;313:E631–e640.
  32. Yoon SJ, Park S, Park C, Chang W, Cho DK, Ko YG, et al. Association of soluble receptor for advanced glycation end-product with increasing central aortic stiffness in hypertensive patients. *Coron Artery Dis*. 2012;23:85–90.
  33. Dozio E, Ambrogi F, de Cal M, Vianello E, Ronco C, Corsi Romanelli MM. Role of the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) as a prognostic factor for mortality in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:1347432.
  34. Jabaudon M, Blondonnet R, Pereira B, Cartin-Ceba R, Lichtenstern C, Mauri T, et al. Plasma sRAGE is independently associated with increased mortality in ARDS: a meta-analysis of individual patient data. *Intensive Care Med*. 2018;44:1388–99.
  35. Paradelo-Dobarro B, Fernandez-Trasancos A, Bou-Teen D, Eiras S, Gonzalez-Ferreiro R, Agra RM, et al. Evolution and bad prognostic value of advanced glycation end products after acute heart failure: relation with body composition. *Cardiovasc Diabetol*. 2017;16:115.
  36. Rodríguez-Ruiz E, Lopez-Lago A, Hernandez-Vaquero R, Granja-Gomez I, Estany-Gestal A, Alvarez E, et al. First-days reduction of plasma and skin advanced glycation end products is related to outcome in septic patients. *Shock*. 2019. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001396> [Epub ahead of print].
  37. Grauen Larsen H, Yndigegn T, Marinkovic G, Grufman H, Mares R, Nilsson J, et al. The soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) has a dual phase-dependent association with residual cardiovascular risk after an acute coronary event. *Atherosclerosis*. 2019;287:16–23.
  38. Reichert S, Triebert U, Santos AN, Hofmann B, Schaller HG, Schlitt A, et al. Soluble form of receptor for advanced glycation end products and incidence of new cardiovascular events among patients with cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2017;266:234–9.
  39. Jensen LJ, Flyvbjerg A, Bjerre M. Soluble receptor for advanced glycation end product: a biomarker for acute coronary syndrome. *Biomed Res Int*. 2015;2015:815942.
  40. Grauen Larsen H, Marinkovic G, Nilsson PM, Nilsson J, Engstrom G, Melander O, et al. High plasma sRAGE (soluble receptor for advanced glycation end products) is associated with slower carotid intima-media thickness progression and lower risk for first-time coronary events and mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39:925–33.
  41. Prasad K. Is there any evidence that AGE/sRAGE is a universal biomarker/risk marker for diseases? *Mol Cell Biochem*. 2019;451:139–44.
  42. Tam HL, Shiu SW, Wong Y, Chow WS, Betteridge DJ, Tan KC. Effects of atorvastatin on serum soluble receptors for advanced glycation end-products in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2010;209:173–7.
  43. Forbes JM, Thorpe SR, Thallas-Bonke V, Pete J, Thomas MC, Deemer ER, et al. Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibition in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:2363–72.
  44. Tan KCB, Chow WS, Tso AWK, Xu A, Tse HF, Hoo RLC, et al. Thiazolidinedione increases serum soluble receptor for advanced glycation end-products in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007;50:1819–25.
  45. Tang SC, Wang YC, Li YI, Lin HC, Manzanero S, Hsieh YH, et al. Functional role of soluble receptor for advanced glycation end products in stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:585–94.
  46. Sakaguchi T, Yan SF, Yan SD, Belov D, Rong LL, Sousa M, et al. Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *J Clin Investig*. 2003;111:959–72.
  47. Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, et al. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Investig*. 1996;97:238–43.
  48. Kass DA, Shapiro EP, Kawaguchi M, Capriotti AR, Scuteri A, deGroot RC, et al. Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation*. 2001;104:1464–70.
  49. Oudegeest-Sander MH, Olde Rikkert MG, Smits P, Thijssen DH, van Dijk AP, Levine BD, et al. The effect of an advanced glycation end-product crosslink breaker and exercise training on vascular function in older individuals: a randomized factorial design trial. *Exp Gerontol*. 2013;48:1509–17.
  50. Bakris GL, Bank AJ, Kass DA, Neutel JM, Preston RA, Oparil S. Advanced glycation end-product cross-link breakers. A novel approach to cardiovascular pathologies related to the aging process. *Am J Hypertens*. 2004;17:23s–30s.



# The role of advanced glycation end products in vascular aging: which parameter is the most suitable as a biomarker?

Otto Mayer<sup>1,2</sup> · Július Gelžinský<sup>1,2</sup> · Jitka Seidlerová<sup>1,2</sup> · Markéta Mateřánková<sup>1,2</sup> · Štěpán Mareš<sup>1,2</sup> · Veronika Svobodová<sup>1,2</sup> · Ladislav Trefil<sup>3</sup> · Renata Cífková<sup>4</sup> · Jan Filipovský<sup>1,2</sup>

Received: 20 December 2019 / Revised: 28 February 2020 / Accepted: 28 February 2020  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2020

## Abstract

Advanced glycation end products (AGEs) are involved in several pathophysiologic processes in vascular diseases, including progressive loss of elasticity of the vessel wall (arterial stiffness). Circulating soluble receptors for AGEs (sRAGE) act as a decoy and counterbalanced the harmful properties of AGEs as the natural protective factor. We compared the role of circulating or skin-deposited AGEs and sRAGE regarding the natural course of arterial stiffening. In a prospective cohort study, we longitudinally followed 536 general population-based subjects (subsample of Czech post-MONICA study). Aortic pulse-wave velocity (PWV) was measured twice (at baseline and after ~8 years of follow-up) using a SphygmoCor device (AtCor Medical Ltd), and the intraindividual change in PWV per year ( $\Delta$ PWV/year) was calculated. Concentrations of sRAGE and carboxymethyl lysine (circulating AGEs) were assessed at the follow-up visit by ELISA, while skin AGEs were measured using the autofluorescence-based device AGE Reader. Using multiple regressions, we found significant association between  $\Delta$ PWV/year as a dependent variable, and both, sRAGE and skin AGEs as independent ones (each on its own model). However, the closest associations to  $\Delta$ PWV/year were found for the ratio of these two factors (skin AGEs/sRAGE) [ $\beta$  coeff = 0.0747 (SE 0.0189),  $p < 0.0001$ ]. In a categorized manner, subjects with skin AGEs/sRAGE ratio  $\geq 3.3$  showed about twofold higher risk having  $\Delta$ PWV/year  $\geq 0.2$  m/s [adjusted odds ratio was 2.09 (95% CI: 1.35–3.22),  $p = 0.001$ ]. In contrast, neither circulating AGEs nor circulating AGEs/sRAGE showed any significant relation to  $\Delta$ PWV/year. In conclusion, skin AGEs/sRAGE ratio seems to be a more sensitive biomarker of vascular aging than these single factors themselves or circulation status of AGEs.

## Introduction

Progressive stiffening of the arterial wall is the most typical phenotype of vascular aging. The pathophysiology of this process (collectively known as “arteriosclerosis”) involves several parallel mechanisms [1], from mechanical damage and loss of elasticity, caused by fragmentation of elastin fibers, to

calcification of arterial media, and infiltration by other compounds. Generally, dynamic of arterial stiffening may substantially vary across different individuals, and “vascular age” is not completely equal to “calendar age” for each of us.

Advanced glycation end products (AGEs) represent heterogeneous groups of compounds that arise from non-enzymatic reactions between reducing sugars and biological proteins or lipids [2, 3]. AGEs develop even in euglycemia, but their formation is accelerated in hyperglycemic state, oxidative stress, or prolonged lipid/protein turnover [4]. AGEs interact with their specific membrane receptor (RAGE), and via nuclear factor kappa-B gene expression, activate several other pathophysiologic cascades (release of inflammatory cytokines, increase in oxidative stress, etc.). Clinically, AGEs potentiate multiple microvascular and macrovascular complications, and RAGE is expressed on cardiomyocytes, smooth muscle cells, endothelial cells, and in several other tissues [5, 6]. Rather specific is the deleterious effect of AGEs on the levels of the vessel wall, where AGE–RAGE interaction culminates into cross-linking of collagen fibers. These

✉ Otto Mayer  
mayero@fnplzen.cz

<sup>1</sup> 2nd Department of Internal Medicine, Medical Faculty of Charles University and University Hospital, Pilsen, Czech Republic

<sup>2</sup> Biomedical Center, Medical Faculty of Charles University, Pilsen, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Clinical Biochemistry and Hematology, University Hospital, Pilsen, Czech Republic

<sup>4</sup> Centre for Cardiovascular Prevention of the First Faculty of Medicine, Charles University and Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic



cross-links lead not only to mechanical reinforcement of collagen fibers, but because of higher resistance to enzymatic proteolysis, increase the relative collagen content in the arterial wall; these processes collectively lead to increased arterial stiffness again [7, 8].

However, a pathophysiologic situation on the levels of AGE–RAGE interaction (“AGE–RAGE axis”) is much more complicated [4]. First of all, there are four different species of RAGE: full-length membrane RAGE (generally responsible for the harmful consequences of AGEs), membrane N-truncated RAGE (with a still unknown role), and two circulating C-truncated isoforms, esRAGE and sRAGE. These circulating receptors act as a decoy, competing with full-length RAGE for binding of the ligand (AGEs) [9]. Thus, these circulating isoforms represent natural defense against the deleterious effects of AGEs. Another problem is the interpretation of the results regarding circulating RAGE species, because two contradictory scenarios were described: low concentrations of sRAGE or esRAGE were associated with increased cardiovascular risk (in line with their presumed pathophysiological role) [10], but also high levels of sRAGE were identified as a mortality indicator in acutely ill patients (perhaps the physiological response to acute load of AGEs during stress conditions) [11].

The association between arterial stiffness (quantified using pulse-wave velocity, PWV) and several components of the AGE–RAGE axis (circulating AGEs, sRAGE, or esRAGE) was times reported previously [12–15], but with the exception of our previous recent prospective follow-up study [16], all had a cross-sectional design. Moreover, due to the above-mentioned complexity of AGE–RAGE interaction, a recent summary report [17] advocates to use a ratio between a ligand (AGEs) and its circulating receptor (esRAGE or sRAGE), instead of single factors. In the present analysis, we would like to test this concept using a prospective design, and in the context of a natural course of arterial stiffening (individual increase in aortic PWV during about 8 years) as the dynamic outcome.

## Methods

The study protocol was approved by the local Ethics Committee of the University Hospital in Pilsen, and written informed consent was obtained from all participants of the study. All procedures performed were in accordance with the principles of Good Clinical Practice, formulated in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

### Design and study population

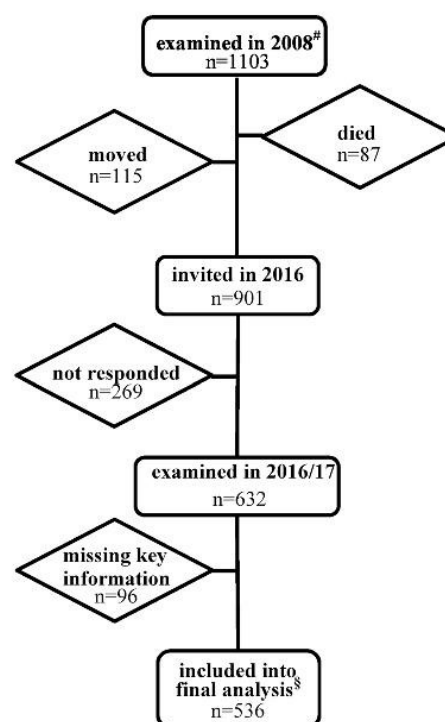
The analysis represents a prospective cohort study of a general population-based sample (Fig. 1). The initial study

sample consisted of 1103 individuals examined as a part of Czech post-MONICA study in 2008. A random 1% sample of Pilsen region residents aged 25–75 years were selected from General Health Insurance Registry—all details are reported elsewhere [15, 18]. From this sample (examined in 2008), over time, 115 subjects had moved and 87 deceased; therefore, 901 individuals were eventually invited to attend clinical examination.

A total of 632 subjects responded to our invitation (70.1% response rate) to attend the second visit (follow-up examination) after ≈8 years or more. However, PWV measurements or AGE–RAGE axis parameters were unavailable or lack appropriate quality in 96 subjects, and they had to be excluded from the final analysis. Thus, the total analyzed population consisted of 536 subjects who have two PWV measurements ≈8 years apart available (i.e., from baseline examination in 2008 and from follow-up visit in 2016/17).

### Clinical examination and laboratory analysis

We obtained information on each subject’s personal characteristics, personal and family history of coronary artery disease, lifestyle (smoking, drinking, exercise habits, etc.), and pharmacotherapy. Height and weight were measured



**Fig. 1 Study flowchart.** #Baseline examination, i.e., the first PWV measurement; §follow-up examination, i.e., the second PWV measurement. AGE–RAGE axis components, estimated at this time point, were used as key exploratory variables.



using a SECA 767 (SECA GmbH & co, Hamburg, Germany) scale with a telescopic measuring rod. Body mass index (BMI) was calculated as body weight (kg)/height<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>). Blood pressure (BP) was measured using auscultatory technique with standard mercury sphygmomanometers at baseline, and with auscultatory-controlled electronic NISSEI DM-3000 device (NISSEI, Tokyo, Japan) at follow-up. Appropriate-size arm cuffs were used. Three consecutive BP measurements were taken in a patient in sitting position on the right arm; the average BP was determined as the average of the second and third measurements.

The properties of large arteries were measured based on a 2006 Expert Consensus Document [19]. Arterial measurements were obtained after 15 min of rest in the supine position in a quiet room, using a SphygmoCor MM3 device (AtCor Medical Ltd, Sydney, NSW, Australia). Aortic PWV was measured between carotid and femoral arteries. It was calibrated by measuring BP on the contralateral arm before the recordings. The distance between the carotid pulsation and jugular fossa, and between the jugular fossa and femoral recording site, was measured on the body surface. The travel distance along the aorta was calculated by subtracting these two distances. Registrations of the pulse waves were ECG-gated, so we could calculate the time shift between the appearance of the wave at the first and second sites. PWV was calculated as the ratio of the travel distance (m) and the transit time (s), and the average of two recordings was used for analysis. Two recordings were usually performed, but another recording was done if the difference between recordings was greater than 0.5 m/s.

Skin AGEs were quantified by AGE Reader<sup>®</sup> (Diagnoptics Technologies B.V., Groningen, The Netherlands), a noninvasive technology that uses ultraviolet light to excite autofluorescence of specific AGEs (pentosidine, N<sup>ε</sup>-carboxymethyl lysine, and N<sup>ε</sup>-carboxyethyl lysine) in human skin [20]. We performed three recordings in each subject, and the average was used for analysis (the intraindividual variability of measurements was very low, about 4.4% on average).

Venous blood samples were drawn after at least 12 h of fasting, and all laboratory examinations were realized in series from aliquots stored at -80 °C. We assessed the total and HDL cholesterol, triglycerides, serum creatinine, and glucose levels from serum samples using a Cobas Mira/ROCHE analyzer (ROCHE Diagnostics, Basel, Switzerland) and commercially available kits of the same provenience. LDL cholesterol was calculated using the Friedewald equation, i.e., LDL = total cholesterol - HDL - (TG/2.22). Estimated glomerular filtration (eGFR) was assessed by CKD-EPI formula (using serum creatinine, age, and gender) [21]. The concentration of sRAGE was quantified by ELISA using a Human RAGE Quantikine ELISA Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA).

Circulating AGEs was quantified as serum carboxymethyl lysine (CML) using commercial ELISA kits (Cusabio Technology LLC, Houston, TX, USA).

## Data analysis

As the main indicator of age-dependent progression of arterial stiffness, we used intraindividual change of aortic PWV between baseline and follow-up visit, standardized for 1 year of follow-up ( $\Delta$ PWV/year [m/s]); in other words, follow-up visit PWV *minus* baseline PWV *divided by* the exact time between these visits in days *times* 365. Five AGE-RAGE axis parameters registered at the follow-up visit, i.e., sRAGE, circulating AGEs, skin AGE, circulating AGE to sRAGE ratio (*times* 1000), and skin AGE to sRAGE ratio (*times* 1000) were used as the main independent variables. As covariates, we tested conventional confounders (age, gender...), the main cardiovascular risk factors, and usual treatments (also those registered at the follow-up visit), and if necessary, dichotomized them into binary variables with cutoff points based on the 6th European Guidelines for Cardiovascular Prevention [22]. Moreover, hypertension was defined as systolic BP  $\geq$ 140 mmHg and/or diastolic BP  $\geq$ 90 mmHg, and/or treatment with antihypertensive medication; overt diabetes as fasting glucose  $\geq$ 7.0 mmol/L and/or use of antidiabetic medication; impaired renal function as eGFR  $<$ 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> (Grade 3 or less by The National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) [23]; abnormal HbA1c as  $\geq$ 42 mmol/mol. Furthermore, all five AGE-RAGE axis parameters were divided into quartiles as follows:  $<$ 762, 762–997.9, 998–1338.9, and  $\geq$ 1339 (sRAGE, pg/mL);  $<$ 110, 110–180.2, 180.3–277.9, and  $\geq$ 278 (circulating AGEs, pg/mL);  $<$ 2.1, 2.11–2.4, 2.41–2.8, and  $\geq$ 2.8 (skin AGEs, autofluorescence units);  $<$ 94.3, 94.3–179.1, 179.2–308.4, and  $\geq$ 308.5 (circulating AGEs/RAGE ratio  $\times$  1000);  $<$ 1.658, 1.659–2.396, 2.397–3.288, and  $\geq$ 3.289 (skin AGEs/sRAGE ratio  $\times$  1000), respectively. HbA1c was divided into quartiles as follows:  $<$ 35, 35–37.9, 38–40.9, and  $\geq$ 41 mmol/mol.

Accelerated arterial stiffening was arbitrarily set as  $\Delta$ PWV/year  $\geq$ 0.1 m/s (which is approximately the expected “natural”, age-dependent progression of arterial stiffness, i.e., 1 m/s per age decade [24, 25]) and  $\Delta$ PWV/year  $\geq$ 0.2 m/s (twofold higher increase than should be expected).

For statistical analyses, STATISTICA 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) and STATA 8 (STATA Corp. LP, College Station, TX, USA) software packages were used, and generally conventional statistical methods were applied (see the relevant section of “Results”). Power calculations revealed that our population of subjects is sufficiently large to detect differences in primary estimate ( $\Delta$ PWV/year), with a 5% relative precision level; all variables were tested for normality of distribution, and

**Table 1** Basic characteristics of study sample [mean (standard deviation) or factor proportion].

	Baseline	Follow-up	<i>P</i> value
Age [years]	53.8 (12.3)	61.9 (12.6)	<0.0001
Gender [% of males]	44.3	44.3	–
History of vascular disease <sup>a</sup> [%]	5.2	11.2	<0.0001
Current smoking [%]	30.5	19.2	<0.0001
Body mass index [kg/m <sup>2</sup> ]	26.9 (4.4)	27.7 (4.6)	<0.0001
Body mass index [kg/m <sup>2</sup> ] [%]	21.8	28.8	<0.0001
Systolic blood pressure [mmHg]	127.2 (16.0)	133.2 (17.5)	<0.0001
Diastolic blood pressure [mmHg]	80.9 (9.0)	80.7 (9.5)	0.812
Mean arterial pressure [mmHg]	96.3 (10.3)	98.2 (10.5)	<0.0001
Treatment with antihypertensives [%]	28.5	45.8	<0.0001
Treatment with ACEi or ARBs [%]	18.6	23.6	0.011
Hypertension <sup>b</sup> [%]	41.9	63.2	<0.0001
LDL cholesterol [mmol/L]	3.11 (0.89)	2.99 (0.94)	0.056
LDL cholesterol ≥2.5 mmol/L	75.0	67.5	0.001
Treatments with statins [%]	12.3	25.9	<0.0001
Fasting glycemia [mmol/L]	5.21 (0.82)	5.33 (1.02)	0.005
Hemoglobin A1c	–	39.5 (17.4)	–
Treatment with antidiabetics [%]	1.9	8.8	<0.0001
Overt diabetes <sup>c</sup> [%]	4.1	10.6	<0.0001
Creatinine [μmol/L]	77.4 (12.8)	76.9 (18.9)	<0.0001
Estimated glomerular filtration <sup>d</sup> [mL/min]	86.1 (15.2)	83.6 (17.4)	0.002
Estimated glomerular filtration <60 mL/min/1.73 m <sup>2</sup>	3.9	9.5	<0.0001
Aortic pulse-wave velocity [m/s]	7.59 (2.02)	9.07 (2.32)	<0.0001
sRAGE [pg/mL]	1325.1 (516.1)	1106.5 (510.8)	<0.0001
Circulating AGEs (carboxymethyl lysine) [pg/mL]	n/a	225.0 (186.5)	–
Skin AGEs [AU]	n/a	2.45 (0.57)	–
Circulating AGEs/sRAGE [ratio × 1000]	n/a	262.5 (343.2)	–
Skin AGEs/sRAGE [ratio × 1000]	n/a	2.45 (0.57)	–

ACEi angiotensin-converting enzyme inhibitors, ARBs angiotensin II receptor blockers, LDL low-density lipoprotein, sRAGE soluble receptor for advanced glycation end products, AGEs advanced glycation end products.

*P* value by Wilcoxon's paired test (continuous variables) or  $\chi^2$  test (categorized variables).

<sup>a</sup>History of myocardial infarction, ischemic stroke, peripheral vascular disease, or atherosclerosis in other localization, including all revascularizations.

<sup>b</sup>Systolic blood pressure ≥140 and/or diastolic blood pressure ≥90 mmHg, and/or treatment with antihypertensives.

<sup>c</sup>Fasting glycemia ≥7 mmol/L and/or treatment with antidiabetics.

<sup>d</sup>By CKD-EPI standard (see "Methods").

the appropriate statistical test was chosen. Statistical significance was considered present at *P* value of 0.05.

## Results

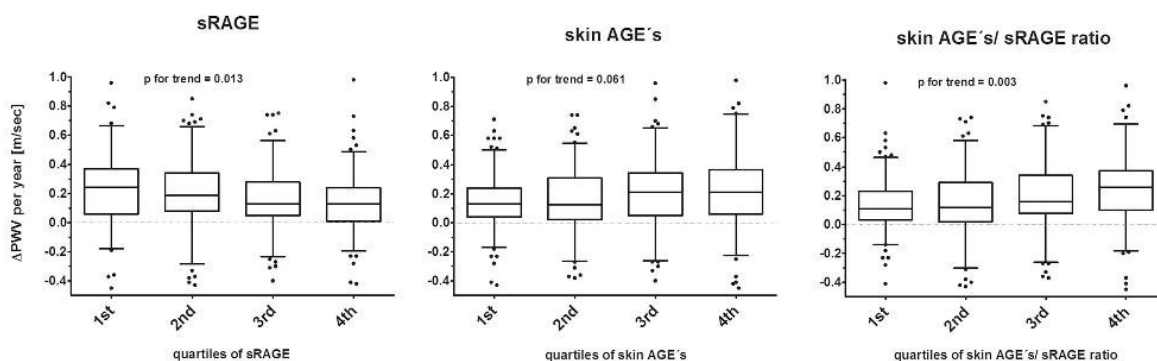
The study cohort consisted of 536 subjects (237 males and 299 females), with a median follow-up of 2918 (IQR: 2783–3612) days. The median intraindividual increase in PWV between baseline and follow-up visit ( $\Delta$ PWV) was 1.28 (IQR: 0.40–2.50) m/s, standardized as 0.16

(0.05–0.31) m/s per year. Detailed baseline characteristics are listed in Table 1.

### Individual course of PWV and AGE–RAGE axis parameters

A series of analysis was performed to assess the association between each of five AGE–RAGE axis parameters at the follow-up visit,  $\Delta$ PWV/year, and already-known covariates of arterial stiffness and conventional factors. Univariate analysis using Spearman's rank correlation revealed the





**Fig. 2 Individual development in arterial stiffness during follow-up ( $\Delta$ PWV/year) in quartiles of different AGE–RAGE axis parameters [box-and-whisker plots (medians and 95% confidence**

intervals)]. *p* Value adjusted for age, gender, and mean arterial pressure, for quartile limits see “Methods”.

significant association between  $\Delta$ PWV/year on one side and sRAGE ( $r = -0.169$ ,  $P = 0.0001$ ), skin AGEs ( $r = 0.142$ ,  $P = 0.0010$ ), and skin AGEs/sRAGE ratio ( $r = 0.207$ ,  $p < 0.0001$ ) on the other. In contrast, no such association was observed with respect to circulating AGEs ( $r = 0.023$ ,  $p = 0.593$ ), and a rather weak relation between  $\Delta$ PWV/year and circulating AGEs/sRAGE ratio ( $r = 0.087$ ,  $p = 0.0436$ ). Similar trends were observed also in a semicontinuous manner, if five tested AGE–RAGE axis parameters were dichotomized into quartiles. We found significant inverse trend in  $\Delta$ PWV/year across sRAGE quartiles, and a positive trend across skin AGEs or skin AGEs/sRAGE quartiles (Fig. 2). However, no apparent differences across circulating AGEs and circulating AGEs/sRAGE quartiles were found ( $p = 0.819$  and  $p = 0.484$ , respectively, not in Fig. 2).

As the next step, we performed a series of multiple linear regression to test the association between  $\Delta$ PWV/year and each of AGE–RAGE axis parameters in the context of potential covariates (conventional risk factors, reported pharmacotherapy, or other characteristics known to be associated with arterial stiffness) in Table 2. Independent association remained after complex adjustment for sRAGE (model A), skin AGEs (model C), and their ratio (model E). Again, no associations were observed between  $\Delta$ PWV/year and circulating AGEs (model B) or circulating AGEs/sRAGE ratio (model D). All these regressions were performed either with fasting glucose or with HbA1c as covariates, with nearly identical results, regarding AGE–RAGE axis components.

Finally, we included all five explored parameters into one stepwise regression model (Table 2, model F). Both sRAGE and skin AGEs/sRAGE ratio jointly entered the regression model (along with current smoking, mean arterial pressure, and treatment with antihypertensives) and independent covariates of  $\Delta$ PWV/year. However, with mandatory inclusion of age and gender in the same model, only

skin AGEs/sRAGE ratio remained significant covariates of  $\Delta$ PWV/year (not in the table).

### Predictive power of different AGE–RAGE axis parameters to accelerated age-dependent stiffening

For the purpose of this analysis, we used the  $\Delta$ PWV/year, arbitrarily dichotomized into two categories ( $\geq 0.2$  and  $\geq 0.1$  m/s) as “accelerated arterial stiffening” (dependent variable) and multivariate logistic regression was applied (Table 3).

In semicontinuous arrangement (model A) and after adjustment for potential covariates (see footnote of Table 3), an increase in sRAGE amounting to one quartile was associated with about 21% lower relative risk of accelerated arterial stiffening, defined as  $\Delta$ PWV/year  $\geq 0.2$  m/s, or 17% lower risk, if defined as  $\Delta$ PWV/year  $\geq 0.1$  m/s (both statistically significant). Similarly, an increase in skin AGEs/sRAGE ratio by one quartile resulted in 35% or 29% higher risk of  $\Delta$ PWV/year  $\geq 0.2$  or  $\geq 0.1$  m/s, respectively. In contrast, neither circulating AGEs nor circulating AGEs/sRAGE ratio did not show similar predictive potential, and only marginal power was observed in these terms for skin AGEs (Table 3, model A).

As a next step, we performed the analysis in fully categorized arrangement (Table 3, model B), i.e., 1st quartile versus 2nd–4th for sRAGE, while 4th versus 1st–3rd quartile of other four tested parameters. Low sRAGE (1st quartile) was associated with  $\approx 60\%$  higher risk of accelerated aortic stiffening, defined as  $\Delta$ PWV/year  $\geq 0.2$  m/s, but predictive potential disappeared if  $\Delta$ PWV/year  $\geq 0.1$  m/s was used as a dependent variable. High skin AGEs/sRAGE ratio (4th quartile) was associated with increased risk of accelerated arterial stiffening, defined either as  $\Delta$ PWV/year  $\geq 0.2$  m/s or as  $\geq 0.1$  m/s.

As a final step, we repeated all the above-mentioned regression models, but after excluding 56 subjects with

**Table 2** Multivariate association between individual increase in pulse-wave velocity during follow-up ( $\Delta$ PWV/year) and its covariates.

	Model A		Model B		Model C	
Age	0.0020 (0.0011)	0.088	0.0025 (0.0011)	0.027	0.0011 (0.0013)	0.396
Male gender	0.0383 (0.0213)	0.073	0.0444 (0.0213)	0.037	0.0399 (0.0213)	0.062
History of vascular disease	0.0291 (0.0351)	0.408	0.0313 (0.0354)	0.377	0.0275 (0.0352)	0.435
Current smoking	-0.0335 (0.0266)	0.208	-0.0315 (0.0270)	0.244	-0.0550 (0.0277)	0.048
Body mass index	0.0004 (0.0025)	0.882	0.0017 (0.0025)	0.486	0.0014 (0.0025)	0.573
Mean arterial pressure	0.0034 (0.0011)	0.001	0.0034 (0.0011)	0.001	0.0035 (0.0011)	0.001
LDL cholesterol	0.0086 (0.0123)	0.489	0.0070 (0.0124)	0.572	0.0057 (0.0124)	0.645
Hemoglobin A1c	0.0008 (0.0007)	0.264	0.0009 (0.0008)	0.252	0.0009 (0.0008)	0.212
Estimated glomerular filtration	-0.0008 (0.0008)	0.305	-0.0005 (0.0008)	0.481	-0.0005 (0.0008)	0.531
Antihypertensives	-0.0655 (0.0253)	0.01	-0.0659 (0.0255)	0.01	-0.0667 (0.0253)	0.009
Statins	-0.0350 (0.0276)	0.208	-0.0353 (0.0280)	0.208	-0.0368 (0.0278)	0.186
Antidiabetics	0.0477 (0.0406)	0.241	0.0469 (0.0409)	0.252	0.0428 (0.0407)	0.294
sRAGE	-0.1251 (0.0562)	0.026	Not included	-	Not included	-
Circulating AGEs	Not included	-	-0.00003 (0.00006)	0.609	Not included	-
Skin AGEs	Not included	-	Not included	-	0.0532 (0.0226)	0.019
Circulating AGEs/sRAGE ratio	Not included	-	Not included	-	Not included	-
Skin AGEs/sRAGE ratio	Not included	-	Not included	-	Not included	-
const.	0.0471 (0.2104)	0.823	Not included	0.029	-0.3835 (0.1571)	0.015

	Model D		Model E		Model F <sup>a</sup>	
Age	0.0024 (0.0011)	0.034	0.0016 (0.0012)	0.167	Not entered	-
Male gender	0.0447 (0.0213)	0.036	0.0401 (0.0213)	0.06	Not entered	-
Vascular disease	0.0295 (0.0355)	0.407	0.0273 (0.0352)	0.439	Not entered	-
Current smoking	-0.0320 (0.0269)	0.236	-0.0398 (0.0266)	0.135	-0.619 (0.0267)	0.021
Body mass index	0.0016 (0.0025)	0.532	0.0006 (0.0025)	0.814	Not entered	-
Mean arterial pressure	0.0034 (0.0011)	0.001	0.0035 (0.0011)	0.001	0.0038 (0.0010)	<0.0001
LDL cholesterol	0.0073 (0.0124)	0.555	0.0085 (0.0124)	0.493	Not entered	-
Hemoglobin A1c	0.0008 (0.0008)	0.263	0.0009 (0.0007)	0.249	Not entered	-
Estimated glomerular filtration	-0.0005 (0.0008)	0.485	-0.0007 (0.0008)	0.352	Not entered	-
Antihypertensives	-0.0664 (0.0254)	0.009	-0.0645 (0.0254)	0.011	-0.0562 (0.0217)	0.01
Statins	-0.0339 (0.0279)	0.225	-0.0378 (0.0278)	0.174	Not entered	-
Antidiabetics	0.0462 (0.0409)	0.258	0.0492 (0.0406)	0.227	Not entered	-
sRAGE	Not included	-	Not included	-	-0.1474 (0.0532)	0.006
Circulating AGEs	Not included	-	Not included	-	Not entered	-
Skin AGEs	Not included	-	Not included	-	Not entered	-
Circulating AGEs/sRAGE ratio	$5.66 \times e^{-06}$ (0.00003)	0.856	Not included	-	Not entered	-
Skin AGEs/sRAGE ratio	Not included	-	0.0136 (0.0057)	0.018	0.0747 (0.0189)	<0.0001
Const.	-0.3451 (0.6508)	0.027	-0.3451 (0.1556)	0.027	-0.2921 (0.1566)	0.063

Multiple linear regression with  $\Delta$ PWV/year as a dependent variable [ $\beta$  coeff (SEM)]; log transformation was done for sRAGE.

Values from the follow-up visit were used for this analysis.

<sup>a</sup>Stepwise model.

overt diabetes at the follow-up visit. The results were confirmatory to analyses performed in a full sample (Table 3).

We also exploratorily repeated all analyses in Table 3, but using HbA1c, instead of AGE-RAGE axis components. No significant relation of this parameter to increased risk of

accelerated arterial stiffening was found either in all samples [odds ratio for increase in HbA1c amounting to one quartile was 0.98 (95% CI: 0.80–1.20), while 1.38 (95% CI: 0.84–2.27) for HbA1c  $\geq$  42 mmol/mol, if  $\Delta$ PWV/year  $\geq$  0.2 m/s was used as a dependent variable], or if patients with overt diabetes were excluded.



**Table 3** Fully adjusted association between each of the AGE–RAGE axis parameters and accelerated age-dependent increase in aortic PWV.

Dependent variable	Model A (semicontinuous)			
	$\Delta$ PWV/year $\geq 0.1$ m/s		$\Delta$ PWV/year $\geq 0.2$ m/s	
All subjects ( $n = 536$ )				
Decrease in sRAGE by one quartile	0.84 (0.71–0.99)	0.037	0.79 (0.67–0.94)	0.006
Increase in circulating AGEs by one quartile	0.98 (0.83–1.16)	0.828	0.93 (0.78–1.10)	0.386
Increase in skin AGEs by one quartile	1.10 (0.92–1.32)	0.304	1.20 (1.01–1.44)	0.044
Increase in circulating AGEs/sRAGE by one quartile	1.03 (0.87–1.22)	0.739	1.01 (0.85–1.19)	0.935
Increase in skin AGEs/sRAGE by one quartile	1.29 (1.08–1.54)	0.005	1.35 (1.14–1.61)	0.001
Nondiabetic only ( $n = 479$ )				
Decrease in sRAGE by one quartile	0.88 (0.74–1.05)	0.152	0.84 (0.70–0.99)	0.043
Increase in circulating AGEs by one quartile	0.97 (0.81–1.15)	0.697	0.90 (0.75–1.07)	0.233
Increase in skin AGEs by one quartile	1.08 (0.90–1.31)	0.403	1.22 (1.01–1.47)	0.039
Increase in circulating AGEs/sRAGE by one quartile	1.02 (0.85–1.21)	0.859	0.76 (0.48–1.21)	0.247
Increase in skin AGEs/sRAGE by one quartile	1.21 (1.00–1.45)	0.046	1.29 (1.07–1.54)	0.007
Dependent variable	Model B (categorized)			
	$\Delta$ PWV/year $\geq 0.1$ m/s		$\Delta$ PWV/year $\geq 0.2$ m/s	
All subjects ( $n = 536$ )				
sRAGE <762 pg/mL	1.30 (0.84–2.01)	0.241	1.57 (1.03–2.38)	0.035
Circulating AGEs $\geq 278$ pg/mL	1.15 (0.74–1.79)	0.537	1.04 (0.68–1.59)	0.868
Skin AGEs $\geq 2.8$	1.22 (0.77–1.95)	0.404	1.26 (0.81–1.98)	0.31
Circulating AGEs/sRAGE $\geq 309$	1.01 (0.65–1.56)	0.96	0.88 (0.58–1.35)	0.564
Skin AGEs/sRAGE $\geq 3.3$	1.89 (1.18–3.03)	0.008	2.09 (1.35–3.22)	0.001
Nondiabetic only ( $n = 479$ )				
sRAGE <762 pg/mL	1.18 (0.75–1.85)	0.484	1.42 (0.91–2.22)	0.118
Circulating AGEs $\geq 278$ pg/mL	1.15 (0.72–1.84)	0.557	0.97 (0.61–1.55)	0.913
Skin AGEs $\geq 2.8$	1.22 (0.74–2.01)	0.445	1.39 (0.85–2.27)	0.186
Circulating AGEs/sRAGE $\geq 309$	0.92 (0.58–1.46)	0.725	0.97 (0.81–1.16)	0.908
Skin AGEs/sRAGE $\geq 3.3$	1.73 (1.05–2.84)	0.03	2.00 (1.26–3.19)	0.003

Multiple logistic regression with  $\Delta$ PWV/year  $\geq 0.1$  or  $\geq 0.2$  m/s as dependent variables [odds ratios (95% confidence intervals)], following covariates, was included into full models: age  $\geq 65$  years, gender, history of vascular disease, current smoking, body mass index  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, hypertension, LDL cholesterol  $\geq 2.5$  mmol/L, treatment with statins, overt diabetes (in “all subjects” analysis *only*), and estimated glomerular filtration <60 mL/min (for definitions and frequencies see Table 1).

## Discussion

In this study, we compared five different expressions of AGE–RAGE axis activity to find the best match with a natural course of vascular aging in the general population. Two primary estimated parameters, circulating sRAGE and skin AGEs (measured noninvasively using autofluorescence technique), showed significant independent association with individual dynamics of arterial stiffening during  $\approx 8$  years, but the closest association was observed for the ratio of these two factors, i.e., skin AGEs/sRAGE ratio. This result seems to be also biologically plausible, because this ratio represents the joint factor of the individual course of deposition of AGEs in solid tissue on one side, and the activity of the protective factor on the other. The key finding of our study is that high

skin AGEs/sRAGE ratio ( $\geq 3.3$ ), i.e., mutual combination of accelerated individual deposition of AGEs in previous years with failed protection factor against this process, was associated with twofold higher relative risk of  $\Delta$ PWV/year  $\geq 0.2$  m/s ( $= 2$  m/s per age decade). Taking into account that “natural course” (average age-dependent increase) of arterial stiffening is consistent with the increase in PWV by 1 m/s per age decade [24], we can interpret this finding that individuals with high skin AGEs/sRAGE ratio have twice as fast vascular aging, than subjects with a lower ratio. Indeed, this association remained significant also after adjustment for other potential covariates of arterial stiffening (age, gender, BP, chronic pharmacotherapy...).

Our findings are in agreement with already-known evidence. Several cross-sectional studies confirmed the role of

sRAGE in pathophysiology of arterial stiffness. We have already shown in a cross-sectional population-based study that nondiabetic hypertensive subjects with decreased sRAGE (<918 pg/mL) have significantly higher aortic PWV than those with higher circulation concentration levels [15]. In line with this finding, also Dimitriadis et al. [14] demonstrated an inverse relation between sRAGE and aortic PWV, and another study group showed an association between sRAGE and pulse pressure [9]. Finally, our recent study demonstrated even in a prospective cohort design, that high status of circulating sRAGE at baseline acted protectively against accelerated age-dependent increase in aortic PWV during follow-up [16]. With one exception, only smaller and usually highly selected population studies were available to confirm the association between skin auto-fluorescence AGEs and arterial stiffness. Watfa et al. [26] found an association between aortic PWV and skin AGEs in 55 nondiabetic individuals, younger than 65 years (but not in older subjects). Similar association was reported in 120 patients with end-stage renal disease *plus* 110 control subjects [27], and additionally, also in 105 type I diabetic patients in another cross-sectional study [28]. The largest part of the evidence represents the Maastricht study that confirmed the independent relation between aortic PWV and skin AGEs in 862 participants (including normoglycemic subjects, those with impaired glucose metabolism, as well as type II diabetic patients). However, no study was dealing with the ratio to circulating sRAGE, and no one tested the PWV as a longitudinal prospective variable, until now.

In this study, we did not find any relation between  $\Delta$ PWV/year (or just PWV at the follow-up visit) and circulating AGEs (serum CML), either as a single factor or in ratio with sRAGE. In contrast, a study by McNulty et al. [12] reported a positive association between CML and arterial stiffness in hypertensive patients, and similar association was found in older subjects in another general population-based cross-sectional analysis [13]. In line with these two observations, we performed an exploratory sub-analysis, limited to hypertensive patients, aged  $\geq 65$  years (not mentioned in “Results”). A marginally significant association (with  $p = 0.030$ ) was found between  $\Delta$ PWV/year and circulating AGEs (as continuous variables and by multivariate linear regression), but the subsample used was rather limited ( $n = 191$ ). Indeed, an association between CML and PWV was reported in diabetic patients [29], but we were not able to repeat this analysis (due to low sample size). The missing association of CML with arterial stiffness in our study can be explained by biological behavior of this factor. Namely, this substance represents a non-cross-linking member of “AGEs family”, i.e., it is able to bind to only one protein residue [30]. Thus, circulating status of CML probably does not give the best information, in the context of the fact that the pathophysiological target of

glycation is solid tissue, and plasma concentrations of AGEs give only indirect information. It can be speculated that circulating CML reflects the increased activity of the AGE–RAGE axis only, and especially in more affected subjects, while in generally healthy persons lacking the necessary sensitivity. That would mean we just chose a less-sensitive biomarker of the circulating status of AGEs, while another can be more appropriate (e.g., high-mobility group box 1, a cross-linking member of “AGEs family” [31]).

It holds true that individual dynamics of tissue deposition of AGEs is completely different in patients with overt diabetes, and moreover, antidiabetic treatment can play a role in these terms. Therefore, we repeated the main analysis also after excluding all patients with overt diabetes, i.e., those already treated with any antidiabetic drugs or with fasting glycemia  $\geq 7$  mmol/L (see Table 3), or also excluding those with treatment (not mentioned in “Results”); the results were confirmatory to the main findings. We also performed exploratory analysis only in subjects with overt diabetes (not mentioned in “Results”). The predictive power raised for low sRAGE (<918 pg/mL) [with adjusted odds ratio for  $\Delta$ PWV/year  $\geq 0.2$  m/s was 5.21 (1.22–22.32),  $p = 0.026$ ], but surprisingly was no more significant for skin AGEs/sRAGE ratio [3.25 (0.87–12.11),  $p = 0.08$ ]. However, the subsample of diabetic patients was too small ( $n = 56$ ) to draw more conclusions.

### Potential clinical implications

The mandatory question in any kind of biomarker is its relevance regarding subsequent specific treatment or any other clinical application (stratification of disease, personalization of therapeutic approach, etc.). Currently, no specific AGE- or arterial stiffness-directed treatment exists. The clinical development of alagebrium, a nonenzymatic breaker of AGEs, causing cross-links between collagen fibers, was interrupted several years ago [32]. Exogenous administration of recombinant sRAGE was also tested, but only in animal models [33, 34]. Nearly all types of antihypertensives decrease arterial stiffness, but its potential benefit through this mechanism can be only hardly substantiated from their primary therapeutic effects (decrease in BP). More promising seems to be in this way new classes of antidiabetics, namely SGLT-2 (sodium–glucose cotransporter-2) inhibitors. It has been suggested that evident renoprotective effect of SGLT-2 inhibitors is mediated through a pathway involving HMGB1, another member of AGE family [35]. Treatment with SGLT-2 inhibitor was also followed by a decrease in aortic PWV in diabetic patients [36]. The beneficial effect mediated by the AGE–RAGE axis was reported also in another newer group of antidiabetics, glucagon-like peptide-1 receptor agonists, [37, 38], and also this kind of drugs has potential to decrease arterial stiffness [37]. The crucial advantage of these new



classes of antidiabetics is that they can be safely used also in nondiabetic subjects, and one of its potential indications can be supposedly vascular protection against AGEs. We can speculate that a biomarker in the form of proposed skin AGEs/sRAGE ratio may be potentially useful to identify the target population, and to objectify the effect of the treatment.

### Study limitations

First of all, as indicators of the activity of AGE–RAGE axis, we used the individual values from the follow-up visit and not from baseline (which is more conventional in prospective studies). The reason is technical: the analysis allows two measurements of PWV, but the autofluorescence quantification of skin AGEs was not available to us in 2008. Moreover, we have not availed serum aliquots to estimate the baseline serum AGEs (after more than 10 years from baseline visit). On the other hand, the age-dependent stiffening and AGE deposition are probably continuous and linear processes, and only its dynamics (steepness) may individually vary. Hence, it may be less important to which part of the continuum the factors relate. We are able to compare the association between  $\Delta$ PWV/year and either baseline or follow-up concentration of sRAGE, with virtually similar results. We believe that the time factor will not play a major role in other parameters as well.

Second, we did not measure esRAGE, another circulating species of RAGE with presumed similar physiological properties, like sRAGE. Since the physiological levels of sRAGE are about five times higher than esRAGE, the skin AGEs/sRAGE seems to be a more sensitive biomarker than skin AGEs/esRAGE.

Finally, our study cohort is based on a random population sample, but as in other surveys, we strongly depend on the willingness of volunteers to attend the examination program (in our case, twice—at baseline and again after  $\approx$ 8 years). It is a well-known phenomenon that this kind of survey is attended paradoxically by a relatively healthier part of the population. Thus, our results are not fully generalizable.

### Conclusions

Both low concentration of circulating sRAGE and high status of skin AGEs were associated with individually accelerated age-dependent increase in aortic PWV, in middle-aged general population. However, as the most sensitive biomarker seems to be a ratio of both factors, it gives complex information about target damage (AGE deposition) and activity of the protective mechanism in one joint parameter. In contrast, circulating status of AGEs and its ratio to sRAGE were unrelated to individual

dynamics of arterial stiffening. To our knowledge, our analysis demonstrated these facts for the first time in a prospective design.

### Study highlights

#### What is already known

- Advanced vascular end-product deposition is a pivotal process of vascular aging.
- This process is naturally balanced by a specific soluble receptor (sRAGE).

#### What this study adds

- Individual course of arterial stiffening during  $\approx$ 8 years was ascertained.
- Skin AGE to sRAGE ratio showed an independent association with this process.

**Acknowledgements** The study realization was supported by the Health Development Agency of Czech Ministry of Health (project 15-27109), by Charles University Research Fund (PROGRES, project Q39), and by Ministry of Health, Czech Republic—conceptual development of research organization (FNPI, 00669806). We would like to acknowledge the hard work of all investigators and other coworkers (study nurses, laboratory technicians, medical students, ...) who participated in the post-MONICA project. Namely, we are grateful to Mrs Martina Peřtová for her excellent collaboration, and last but not least, to all study subjects, who voluntarily responded to the very time-consuming clinical examination program.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

### References

1. O'Rourke MF, Mancia G. Arterial stiffness. *J Hypertens*. 1999;17:1–4.
2. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114:597–605.
3. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Investig*. 1997;99:457–68.
4. Prasad K. Low levels of serum soluble receptors for advanced glycation end products, biomarkers for disease state: myth or reality. *Int J Angiol*. 2014;23:11–6.



5. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YCE, et al. Cloning and expression of a cell-surface receptor for advanced glycosylation end-products of proteins. *J Biol Chem*. 1992;267:14998–5004.
6. Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*. 2008;196:9–21.
7. Schnider SL, Kohn RR. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glycosylation of human skin collagen. *J Clin Investig*. 1981;67:1630–5.
8. Vasan S, Zhang X, Kapurniotu A, Bernhagen J, Teichberg S, Basgen J, et al. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature*. 1996;382:275–8.
9. Geroldi D, Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Calcagnino M, Buzzi MP, et al. Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end-products in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 2005;23:1725–9.
10. Grauen Larsen H, Marinkovic G, Nilsson PM, Nilsson J, Engstrom G, Melander O, et al. High plasma sRAGE (soluble receptor for advanced glycation end products) is associated with slower carotid intima-media thickness progression and lower risk for first-time coronary events and mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39:925–33.
11. Jabaudon M, Blondonnet R, Pereira B, Cartin-Ceba R, Lichtenstern C, Mauri T, et al. Plasma sRAGE is independently associated with increased mortality in ARDS: a meta-analysis of individual patient data. *Intensive Care Med*. 2018;44:1388–99.
12. McNulty M, Mahmud A, Feely J. Advanced glycation end-products and arterial stiffness in hypertension. *Am J Hypertens*. 2007;20:242–7.
13. Semba RD, Najjar SS, Sun K, Lakatta EG, Ferrucci L. Serum carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, is associated with increased aortic pulse wave velocity in adults. *Am J Hypertens*. 2009;22:74–9.
14. Dimitriadis K, Tsioufis C, Kasiakogias A, Miliou A, Poulakis M, Kintis K, et al. Soluble receptor for advanced glycation end-product levels are related to albuminuria and arterial stiffness in essential hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013;23:382–8.
15. Mayer O, Seidlerova J, Filipovsky J, Vagovicova P, Wohlfahrt P, Cifkova R, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products and increased aortic stiffness in the general population. *Hypertension Res*. 2016;39:266–71.
16. Gelzinsky J, Mayer O Jr., Seidlerova J, Materankova M, Mares S, Kordikova V, et al. Soluble receptor for advanced glycation end-products independently influences individual age-dependent increase of arterial stiffness. *Hypertens Res*. 2020;43:111–20.
17. Prasad K. Is there any evidence that AGE/sRAGE is a universal biomarker/risk marker for diseases? *Mol Cell Biochem*. 2019;451:139–44.
18. Cifkova R, Skodova Z, Bruthans J, Adamkova V, Jozifova M, Galovcova M, et al. Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. Czech MONICA and Czech post-MONICA. *Atherosclerosis*. 2010;211:676–81.
19. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006;27:2588–605.
20. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN, Links TP, Jager JJ, Alderson NL, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia*. 2004;47:1324–30.
21. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009;150:604–12.
22. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis*. 2016;252:207–74.
23. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*. 2002;39:S1–266.
24. Herbert A, Cruickshank JK, Laurent S, Boutouyrie P. Establishing reference values for central blood pressure and its amplification in a general healthy population and according to cardiovascular risk factors. *Eur Heart J*. 2014;35:3122–33.
25. Collaboration TRVfAS. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *Eur Heart J*. 2010;31:2338–50.
26. Watfa G, Soulis G, Tartagni E, Keamey-Schwartz A, Borghi C, Salvi P, et al. Relationship between tissue glycation measured by autofluorescence and pulse wave velocity in young and elderly non-diabetic populations. *Diabetes Metab*. 2012;38:413–9.
27. Ueno H, Koyama H, Tanaka S, Fukumoto S, Shinohara K, Shoji T, et al. Skin autofluorescence, a marker for advanced glycation end product accumulation, is associated with arterial stiffness in patients with end-stage renal disease. *Metabolism*. 2008;57:1452–7.
28. Osawa S, Katakami N, Kuroda A, Takahara M, Sakamoto F, Kawamori D, et al. Skin autofluorescence is associated with early-stage atherosclerosis in patients with type 1 diabetes. *J Atheroscler Thromb*. 2017;24:312–26.
29. Llaurodo G, Ceperuelo-Mallafre V, Vilardell C, Simo R, Gil P, Cano A, et al. Advanced glycation end products are associated with arterial stiffness in type 1 diabetes. *J Endocrinol*. 2014;221:405–13.
30. Ahmed N. Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pr*. 2005;67:3–21.
31. Reddy MC, Christensen J, Vasquez KM. Interplay between human high mobility group protein 1 and replication protein A on psoralen-cross-linked DNA. *Biochemistry*. 2005;44:4188–95.
32. Bakris GL, Bank AJ, Kass DA, Neutel JM, Preston RA, Oparil S. Advanced glycation end-product cross-link breakers. A novel approach to cardiovascular pathologies related to the aging process. *Am J Hypertens*. 2004;17:23s–30s.
33. Sakaguchi T, Yan SF, Yan SD, Belov D, Rong LL, Sousa M, et al. Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *J Clin Investig*. 2003;111:959–72.
34. Tang SC, Wang YC, Li YI, Lin HC, Manzanero S, Hsieh YH, et al. Functional role of soluble receptor for advanced glycation end products in stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:585–94.
35. Yao Y, Zebboudj AF, Shao E, Perez M, Bostrom K. Regulation of bone morphogenetic protein-4 by matrix GLA protein in vascular endothelial cells involves activin-like kinase receptor 1. *J Biol Chem*. 2006;281:33921–30.
36. Aroor AR, Das NA, Carpenter AJ, Habibi J, Jia G, Ramirez-Perez FI, et al. Glycemic control by the SGLT2 inhibitor empagliflozin decreases aortic stiffness, renal resistivity index and kidney injury. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17:108.
37. Batzias K, Antonopoulos AS, Oikonomou E, Siasos G, Bletsas E, Stampouloglou PK, et al. Effects of newer antidiabetic drugs on endothelial function and arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Diabetes Res*. 2018;2018:1232583.
38. Chen S, Yin L, Xu Z, An FM, Liu AR, Wang Y, et al. Inhibiting receptor for advanced glycation end product (AGE) and oxidative stress involved in the protective effect mediated by glucagon-like peptide-1 receptor on AGE induced neuronal apoptosis. *Neurosci Lett*. 2016;612:193–8.



# 10th Anniversary of the European Association for Predictive, Preventive and Personalised (3P) Medicine - EPMA World Congress Supplement 2020

Olga Golubnitschaja<sup>1</sup> · Ondrej Topolcan<sup>2</sup> · Radek Kucera<sup>2</sup> · Vincenzo Costigliola<sup>3</sup> · EPMA<sup>4</sup>

© The Author(s) 2020

## Abstract

In 2019, the EPMA celebrated its 10th anniversary at the 5th World Congress in Pilsen, Czech Republic. The history of the International Professional Network dedicated to Predictive, Preventive and Personalised Medicine (PPPM / 3PM) is rich in achievements. Facing the coronavirus COVID-19 pandemic it is getting evident globally that the predictive approach, targeted prevention and personalisation of medical services is the optimal paradigm in healthcare demonstrating the high potential to save lives and to benefit the society as a whole. The EPMA World Congress Supplement 2020 highlights advances in 3P medicine.



The historical 1st EPMA World Congress in former Bundestag, Bonn, Germany, September 2011

## Introduction

European Association for Predictive, Preventive and Personalised Medicine has been created in 2009. In 2011 the historical 1st EPMA World Congress took place in Bonn, Germany.

In 2019, the EPMA celebrated its 10th anniversary at the 5th World Congress in Pilsen, Czech Republic. The decade-old professional history of the EPMA is rich in achievements. Herewith we briefly highlight some of them.

**Geographic distribution** of the 3PM-relevant expertise under the EPMA-umbrella started with approximately 20 countries in 2009; currently, the EPMA is represented in 54 countries

### Declarations:

1. The authors declare that they have no competing interest.
2. Permissions by responsible ethic commissions for corresponding contributions have been received and thoroughly check prior to publishing the EPMA World Congress Supplement 2020.
3. Research involving human participants and/or animals was performed in accordance with international regulations.
4. All the patient investigations conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki.
5. Informed consent was obtained from all individual participants included in the corresponding study.

✉ Olga Golubnitschaja  
Olga.Golubnitschaja@ukbonn.de

<sup>1</sup> Predictive, Preventive and Personalised (3P) Medicine, Department of Radiation Oncology, University Hospital Bonn, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany

<sup>2</sup> University Hospital in Pilsen, Medical Faculty in Pilsen, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup> European Medical Association, Brussels, Belgium

<sup>4</sup> European Association for Predictive, Preventive and Personalised Medicine, EPMA, Brussels, Belgium





worldwide who actively promote 3PM concepts in bio/medical sciences and practical medicine strongly benefiting patients and healthcare systems.

The first issue of the **EPMA Journal**, *Springer Nature*, was released in March 2010. In 2018, the journal received its first IF 3.9; in 2020, it reached 4.901. Nowadays the EPMA J. is a highly recognised international forum for 3P medicine operating in a hybrid subscription/open access modus. Scopus CiteScore 2019 of the EPMA J. is 7.7, <https://www.scopus.com/sourceid/19700201201?origin=sourceInfo&zone=refpointrank#tabs=1>, thereby Scopus ranks the EPMA J. amongst the top 3% in the category “Health Policy”, due to highly requested and well-cited strategic papers created by multi-professional groups of EPMA experts such as

- *General report & recommendations in predictive, preventive and personalised medicine 2012: white paper of the European association for predictive, preventive and personalised medicine*. <https://doi.org/10.1186/1878-5085-3-14>.
- *Medicine in the early twenty-first century: paradigm and anticipation – EPMA position paper 2016*. <https://doi.org/10.1186/s13167-016-0072-4>.

**SCImago** top-ranks the EPMA J. in all three categories, namely “Health policy”, “Medical Biochemistry” and “Drug discovery”:

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=19700201201&tip=sid>

In 2018, Springer Nature awarded the below-mentioned article the status of an “article with a potential to change the world” in the category “*Medicine and Public Health*”, <https://www.springernature.com/gp/researchers/campaigns/change-the-world/medicine-public-health>

- *Pregnancy Associated Breast Cancer: The Risky Status Quo and New Concepts of Predictive Medicine*. EPMA J. 2018, <https://doi.org/10.1007/s13167-018-0129-7>.

“**Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine**” is a very successful EPMA/Springer Nature book series which educates both professionals and the general population in 3P medicine. Since 2012, 12 book volumes have been released dedicated to a whole spectrum of PPPM related aspects such as digital health, information technology framework, application of artificial intelligence in healthcare, drug delivery systems, liquid biopsy and multi-level diagnostics, amongst others.

“**Horizon 2020**” is the main European Scientific Programme which EPMA experts have contributed to with 3PM-related protocols as well as with the top-expertise provided by Representatives and Members of the association involved in the evaluation panels.

**EPMA AWARD for EXCELLENCE in BIOMEDICAL SCIENCES** was created in 2017, and the 1st EPMA award was given to Prof. Dr. Josef Flammer, University of Basel, for phenotyping of the “Flammer Syndrome”, which the EPMA international jury panel valued as being of great clinical utility. “**Young professionals in PPPM**” Award was created by the EPMA in 2015. At the international workshops linked to the biannual EPMA World Congresses, the presentations made by young professionals get evaluated by an international jury panel. The best presentations and smart 3PM concepts receive awards that effectively promote the careers of young professionals in innovative bio/medical fields.

**EPMA World Congress 2019 in Pilsen, Czech Republic** attracted 3PM experts from 35 countries. The congress was dedicated to innovation in a broad spectrum of bio/medical fields with a specific focus on the concepts of *predictive diagnostics, targeted prevention and personalisation of medical services* in “Cancer”, “Metabolic Disorders”, “Cardiovascular Disease”, “Neurological, Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disorders”, “Inflammatory Disorders”, “Dentistry”, “Biobanking and Screening Programmes”, “Multi-omics”, “Microbiome, Immune-, Pre- and Probiotics”, and “Innovative Technologies”, among others. Further, there were several new topics presented at the congress: among others these were “Implementation of 3PM Concepts in Plastic Surgery”, “Application of Artificial Intelligence in Medicine – 3PM strategies” and “Medical Use of Cannabis”. The latter topic was discussed in the EU Parliament in 2019, and the EPMA position has been elucidated by the EPMA Representatives; for more information see the below link:

<http://www.epmanet.eu/latest/events/2019/epma-position-on-medical-use-of-cannabis-presented-at-the-eu-parliament>.

Oral and poster presentations provided valuable information regarding pilot projects towards personalised healthcare (e.g. awarded by ICPeMed), individualised patient profiles, multi-level biomarker panels, patient stratification, creation and application of innovative IT-tools, ethical issues, doctor-patient collaboration, optimal structure and organisation of the modern hospital ambitious to practically implement the paradigm change from reactive to predictive, preventive and personalised medicine.

#### **World First 3P Medical Unit**

In March 2020, the historically first worldwide unit dedicated to Predictive, Preventive and Personalised (3P) Medicine led by Secretary-General of the EPMA, Prof. Dr. Olga Golubnitschaja, was created in Germany at the Department of Radiation Oncology, University Hospital, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

**The Influence of Vitamin K Status on the Individual Course of Age-dependent Arterial Stiffening**

Mayer O<sup>\*1,2</sup>, Gelzinsky J<sup>1,2</sup>, Seidlerova J<sup>1,2</sup>, Kucera R<sup>3</sup>, Materankova M<sup>1</sup>, Mares S<sup>1</sup>, Svobodova V<sup>1</sup>, Topolcan O<sup>3</sup>, Cifkova R<sup>4</sup>, Filipovsky J<sup>1,2</sup>, Vermeer C<sup>5</sup>

<sup>1</sup>2nd Department of Internal Medicine, Medical Faculty of Charles University and University Hospital, Pilsen, Czech Republic;

<sup>2</sup>Biomedical Center, Medical Faculty of Charles University, Pilsen, Czech Republic;

<sup>3</sup>Department of Immunochemistry Diagnostics, Medical Faculty of Charles University and University Hospital, Pilsen, Czech Republic

<sup>4</sup>Centre for Cardiovascular Prevention of the First Faculty of Medicine, Charles University and Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic;

<sup>5</sup>Cardiovascular Research Institute CARIM, Maastricht University, The Netherlands

**\*Corresponding author:** Otto Mayer, University Hospital, 2nd Dept. of Internal Medicine, Pilsen CZ  
e.mail: mayero@fnplzen.cz

**Keywords:** Predictive preventive personalized medicine, cardiovascular, matrix  $\gamma$ -carboxyglutamate MGP, pulse wave velocity, vascular aging, Vitamin K



## Background

The progressive loss of elastic properties of large arteries is a typical phenotype of vascular aging. The underlying mechanisms (collectively known as “arteriosclerosis”) involve several natural (age-dependent) pathophysiological processes, such as the fragmentation and thinning of elastin lamellae due to its “material fatigue” from cyclic loading, the cross-linking of collagen fibers by advanced glycation end-products as well as several others [1]. Arteriosclerosis coexists with atherosclerosis (the development of intimal atheromatous plaques) and both processes jointly contribute to individual morbidity risk. Numerous studies have demonstrated that increased stiffness of large central arteries (quantified as aortic pulse wave velocity, PWV) is an independent predictor of morbidity and mortality [2].

One of the most important mechanisms of arteriosclerosis is the calcification of elastic elements in the vessel wall. Vascular or tissue calcification represents a highly regulated and potentially reversible process. On a cellular level, it shares many pathways involved in bone mineralization [3]. The matrix  $\gamma$ -carboxyglutamate protein (matrix Gla protein, MGP) represents the natural factor of the “anti-calcification defense” of human tissues (allowing even a reversal of the calcification process) and vitamin K is the essential co-factor of its maturation to biologically active forms [4]. Circulating desphospho-uncarboxylated isoform of MGP (dp-ucMGP), a biomarker of both vitamin K status and biological activity of MGP, was associated with the extent of vascular calcification, as well as the incidence risk of cardiovascular events [4,5].

Predictive, preventive, personalized medicine (PPPM) strategies for cardiovascular diseases are receiving increasingly more attention of late [6]. The immediate effort should be focused on screening methods and the indication of suitable interventions for particular individuals based on their cardiovascular risk stratification. In concordance with PPPM, new biomarkers and multivariate models are frequently used and the promising results achieved [6].

In line with the physiological role of vitamin K and MGP, we have investigated the association between baseline dp-ucMGP concentrations and the following natural course of arterial stiffening in a prospective study based on the general population setting.

## Methods

The study cohort consisted of 541 individuals with a median follow-up of 8.0 years, all examined as a part of the Czech post-MONICA study in 2008 and 2016/17 [7].

Aortic PWV was obtained after 15 min of rest in a supine position using a Sphygmocor MM3 device ((AtCor Medical Ltd., Sydney, NSW, Australia). Intra-individual PWV difference (follow-up minus baseline value) was divided by the exact time between these two visits and a parameter obtained ( $\Delta$ PWV/year, i.e. individual change of PWV per year of follow-up) to be used as the primary

estimate of individual age-dependent arterial stiffening. Accelerated arterial stiffening was arbitrarily set as  $\Delta$ PWV/year  $\geq 0.2$  m/s. In addition to the basic parameters (lipids, creatinine, glucose, etc.), the concentration of the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) was quantified using ELISA methods (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Dp-ucMGP was quantified in citrate plasma samples using the InaKtif MGP iSYS kit (IDS, Boldon, UK), a pre-commercial automated assay based on the sandwich (dual antibody) ELISA kits developed by VitaK (Maastricht University, The Netherlands).

## Results

Detailed characteristics of the study sample at baseline are shown in Table 1. The univariate association between  $\Delta$ PWV/year and other clinical parameters are shown in Table 2. Age, male gender, history of vascular disease, treatment with antihypertensives, with RAAS blockers and statins all significantly positively correlated with  $\Delta$ PWV, while a negative association was found between sRAGE and baseline PWV. Both baseline PWV and  $\Delta$ PWV per year increased across dp-ucMGP quintiles (Fig. 1) and these trends in both dependent variables remained significant after adjustment for potential covariates, i.e. age, gender, mean arterial pressure, sRAGE, treatment with antihypertensive drugs and with antidiabetics, plus baseline PWV if  $\Delta$ PWV per year was compared (Fig. 1).

**Table 1** Baseline characteristics of study sample mean (SD) or factor proportion

<i>n</i>	530
age[years]	53.9 (12.3)
male gender [%]	45.2
manifest vascular disease [%]	5.3
current smoking [%]	30.6
body mass index[kg/m <sup>2</sup> ]	26.9 (4.4)
systolic blood pressure [mmHg]	127.3 (16.0)
diastolic blood pressure [mmHg]	80.9 (9.0)
mean arterial pressure[mmHg]	96.4 (10.3)
any antihypertensives [%]	29.1
RAAS blockers [%]	18.9
arterial hypertension <sup>#</sup>	42.5
LDL cholesterol[mmol/L]	3.11 (0.89)
statins [%]	12.6
fasting glycemia[mmol/L]	5.21 (0.82)
antidiabetics [%]	1.9
overt diabetes <sup>S</sup> [%]	4.2
estimated glomerular filtration (CKD-EPI) [mL/min]	86.0 (15.3)
sRAGE [pg/mL]	1349 (758)
dp-ucMGP [pmol/L]	536 (273)
warfarin [%]	2.0
baseline PWV [m/s]	7.6 (2.0)

follow-up PWV[m/s]	9.1 (2.3)
$\Delta$ PWV/year <sup>§</sup> [m/s]	0.18 (0.24)

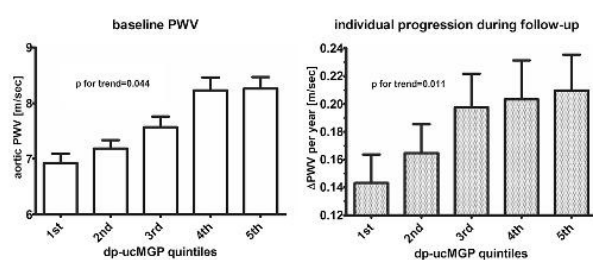
RAAS, renin-angiotensin system; LDL, low-density cholesterol; sRAGE, soluble receptor for advanced glycation end products; dp-ucMGP, desphospho-uncarboxylated matrix Gla protein; PWV, aortic pulse wave velocity

<sup>#</sup> systolic  $\geq 140$  or diastolic blood pressure  $\geq 90$  mmHg, or treatment with antihypertensives; <sup>§</sup> fasting glycemia  $\geq 7$  mmol/L or treatment with anti-diabetics; <sup>§</sup> see Methods for definition; italicized items are highly relevant for conclusions

**Table 2** Association between the individual progression of arterial stiffening ( $\Delta$ PWV per year) and its covariates (Spearman's rank correlation and multiple linear stepwise regression)

	Univariate model		Multivariate step-wise model	
	Spearman's R	<i>p</i> value	$\beta$ coeff. (SE)	<i>p</i> value
age	0.154	0.0003	0.0073 (0.0009)	<0.0001
male gender	0.127	0.0032	0.0515 (0.0177)	0.004
manifest vascular disease	0.094	0.028		
current smoking	0.033	0.45		
body mass index	0.069	0.11		
mean arterial pressure	-0.052	0.23		
LDL cholesterol	-0.036	0.41		
fasting glycemia	0.047	0.28		
estimated glomerular filtration	-0.046	0.28		
any antihypertensives	0.133	0.0019	-0.1279 (0.0445)	0.004
RAAS blockers	0.125	0.0036	0.0466 (0.0209)	0.026
statins	0.106	0.014		
antidiabetics	0.094	0.067		
warfarin	0.023	0.60		
sRAGE	-0.192	<0.0001	0.3498 (0.0674)	<0.0001
baseline PWV	-0.310	<0.0001	-0.0801 (0.0051)	<0.0001
dp-ucMGP	0.128	0.0032	0.1150 (0.0474)	0.016
const.			0.4406 (0.1847)	0.017

log-transformations were done in sRAGE and dp-ucMGP



**Fig. 1** Baseline pulse wave velocity (left panel) and its progression during follow-up ( $\Delta$ PWV per year, right panel) among dp-ucMGP quintiles [mean (standard deviation)]; limits of dp-ucMGP quintiles are as follows:  $\leq 356$ , 357–468, 469–568, 569–690 and  $\geq 691$  pmol/L; *p* value fully adjusted for potential covariates (see Results for details)

Furthermore, arbitrary  $\Delta$ PWV per year  $\geq 0.2$  m/s was used as a dependent variable (reflecting the accelerated individual progression of aPWV during follow-up) and confirmatory results were observed. After adjustment for potential covariates, an increase in dp-ucMGP amounting to one quintile was associated with approximately a 24% higher relative risk of accelerated aortic stiffening (Table 3, model A). A confirmatory finding was found by comparing the 1st quintile of dp-ucMGP with the higher ones (2nd to 5th; Table 3, model B).

**Table 3** Predictors of accelerated individual progression of arterial stiffness ( $\Delta$ PWV per year  $\geq 0.2$  m/s) using multivariate logistic regression models

	Model A		Model B	
	Odds ratio	<i>p</i> value	Odds ratio	<i>p</i> value
age $\geq 65$ years	2.12 (1.28–3.51)	0.004	2.11 (1.27–3.50)	0.004
male gender	1.59 (1.07–2.37)	0.022	1.63 (1.10–2.42)	0.016
manifest vascular disease	1.40 (0.57–3.43)	0.47	1.47 (0.60–3.59)	0.40
current smoking	1.43 (0.95–2.14)	0.10	1.40 (0.93–2.10)	0.10
body mass index $\geq 30$ kg/m <sup>2</sup>	1.25 (0.78–2.00)	0.37	1.31 (0.82–2.10)	0.26
arterial hypertension	0.95 (0.58–1.55)	0.75	0.93 (0.57–1.50)	0.75
LDL cholesterol $\geq 2.5$ mmol/L	1.49 (0.94–2.38)	0.093	1.52 (0.95–2.41)	0.75
overt diabetes	1.04 (0.38–2.83)	0.87	1.09 (0.41–2.93)	0.87
estimated glomerular filtration $\leq 90$ mL/min	1.04 (0.68–1.58)	0.86	1.11 (0.73–1.68)	0.63
RAAS blockers	1.56 (0.86–2.82)	0.11	1.61 (0.89–2.90)	0.11
statins	1.51 (0.79–2.88)	0.21	1.61 (0.84–3.06)	0.15
warfarin	0.38 (0.09–1.61)	0.19	0.50 (0.12–3.00)	0.34
sRAGE $< 881$ pg/mL	1.85 (1.13–3.02)	0.015	1.84 (1.12–3.00)	0.016
baseline PWV $\geq 9$ m/s	0.35 (0.21–0.59)	<0.0001	0.37 (0.22–0.61)	<0.0001
increase of dp-ucMGP by one quintile	1.24 (1.07–1.43)	0.003	–	–
dp-ucMGP in 1st quintile ( $< 357$ pmol/L)	–	–	0.57 (0.35–0.92)	0.021

### Data interpretation

The key finding of this prospective, general population-based study is that vitamin K status plays an important pathophysiological role in the natural, age-dependent progression of arterial stiffening. High vitamin K status (low dp-ucMGP) was independently associated with approximately a 43% lower risk of accelerated individual progression of PWV during 8 years of follow-up (defined as 0.2 m/s per year). It is generally accepted that the “natural course” of vascular aging corresponds to approximately a 1 m/s increase in PWV per decade of life [8]. We might say that during the 8-year follow-up, high vitamin K status “slowed” the aging of arteries by about 5 years compared to the subjects with low vitamin K status.

So far, at least 11 smaller or medium-sized interventional studies have shown that supplementation of iso-vitamin K<sub>2</sub> (menaquinone, MK-7) leads to a decrease in circulating dp-

ucMGP [9]. Moreover, another intervention trial with MK-7 supplementation also demonstrates the effect on arterial stiffness [10]. In line with our observations, the sub-study of the ASTRONOMER trial also indicated high dephosphorylated MGP concentrations independently associated with a higher risk of progression of aortic stenosis [11].

### Conclusions and expert recommendations

- Vitamin K status was identified as an independent predictor of the individual course of arterial stiffening. In theory, it can also be used as a therapeutic target to slow-down vascular aging.
- dp-ucMGP was identified as a promising tool for risk prediction and personalization of cardiovascular prevention.
- In concordance with PPPM principles, we support the creation of new multiparameter algorithms and multivariate models for risk assessment and patient stratification.

### Acknowledgments

Supported by the Health Development Agency of Czech Ministry of Health (project 15-27109), Charles University Research Fund (PROGRES, project Q39), by IDS Plc Boldon, UK, and by FNPI, 00669806.

### References

1. O'Rourke MF, Mancia G. Arterial stiffness. *J Hypertens*. 1999;17:1–4.
2. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2010; <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.10.061>.
3. Keeley FW, Partridge SM. Amino acid composition and calcification of human aortic elastin. *Atherosclerosis*. 1974;19:287–96.
4. Dalmeijer GW, van der Schouw YT, Vermeer C, Magdeleyns EJ, Schurgers LJ, Beulens JW. Circulating matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification and vitamin K status in healthy women. *J Nutr Biochem*. 2013; <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.02.012>.
5. Mayer O Jr., Seidlerová J, Bruthans J, Filipovský J, Timoracká K, Vaněk J, et al. Desphospho-uncarboxylated matrix Gla-protein is associated with mortality risk in patients with chronic stable vascular disease. *Atherosclerosis*. 2014; <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.027>.
6. Golubnitschaja O, Costigliola V, EPMA. General report & recommendations in predictive, preventive, and personalized medicine 2012: white paper of the European Association for Predictive, Preventive, and Personalised Medicine. *EPMA J*. 2012; <https://doi.org/10.1186/1878-5085-3-14>.
7. Barrett M, Boyne J, Brandts J, Brunner-La Rocca HP, De Maesschalck L, et al. Artificial intelligence supported patient self-care in chronic heart failure: a paradigm shift from reactive to predictive, preventive and personalized care. *EPMA J*. 2019 Nov 22;10(4):445–464. <https://doi.org/10.1007/s13167-019-00188-9>.
8. Herbert A, Cruickshank JK, Laurent S, Boutouyrie P; Reference Values for Arterial Measurements Collaboration. Establishing reference values for central blood pressure and its amplification in a general healthy population and according to cardiovascular risk factors. *Eur Heart J*. 2014; <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu293>.
9. Roumeliotis S, Dounousi E, Eleftheriadis T, Liakopoulos V. Association of the Inactive Circulating Matrix Gla Protein with Vitamin K Intake, Calcification, Mortality, and Cardiovascular Disease: A Review. *Int J Mol Sci*. 2019; <https://doi.org/10.3390/ijms20030628>.
10. Knapen MH, Braam LA, Drummen NE, Bekers O, Hoeks AP, Vermeer C. Menaquinone-7 supplementation improves arterial stiffness in healthy postmenopausal women. A double-blind randomized clinical trial. *Thromb Haemost*. 2015; <https://doi.org/10.1160/TH14-08-0675>.
11. Capoulade R, Côté N, Mathieu P, Chan KL, Clavel MA, Dumesnil JG, et al. Circulating levels of matrix Gla protein and progression of aortic stenosis: a substudy of the Aortic Stenosis Progression Observation: Measuring Effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Can J Cardiol*. 2014; <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2014.03.025>.

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat svému školiteli, prof. MUDr. Ottovi Mayerovi Jr, CSc., za odbornou pomoc, vedení, čas a spolupráci při vzniku mých publikací a této disertační práce. Dále bych chtěl poděkovat mému neoficiálnímu konzultantovi, prof. MUDr. Janu Filipovskému, CSc., za věnovaný čas, vedení a pomoc s věcnou, gramatickou a stylistickou stránkou nejen této práce. Nemůžu opomenout ani celý pracovní kolektiv II. interní kliniky FN Plzeň za spolupráci při realizaci proběhlých studií, bez kterých by tato práce nevznikla.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině a blízkému okolí, především sestřám a přátelům za psychickou podporu při psaní a toleranci mého nedostatku času. Závěrem děkuji svému příteli za jeho soustavnou podporu a víru ve mně a moji schopnost dotáhnout studium do konce.