

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



Název

**Oxidační a karbonylový stres, mikrozáněť a kardiovaskulární riziko u pacientů s onemocněním ledvin**

Fibroblastový růstový faktor 23, matrix-metaloproteinázy,  
placentární růstový faktor a  
remodelace levé komory srdeční u nemocných s chronickým onemocněním  
ledvin.

**Oxidative and carbonyl stress, microinflammation and cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease**

Fibroblast growth factor 23, matrix-metalloproteinases,  
placental growth factor and  
left ventricular remodeling in patients with chronic kidney disease

MUDr. Martina Peiskerová

17. 3. 2015

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: Biomedicína

Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSC.

Školící pracoviště: Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1.

LF UK

Školitel: Prof. MUDr. Marta Kalousová, PhD.

Konzultant: Doc. MUDr. Vilém Danzig, PhD.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

| <b>OBSAH:</b>   | <b>Číslo strany</b> |
|---|---------------------|
| Abstrakt  | .....4              |
| Short summary   | .....5              |
| Seznam zkratk   | .....6              |
| 1. ÚVOD   | ....8               |
| 2. CÍLE STUDIE  | ....12              |
| 3. MATERIÁL A METODY  | ...12               |
| 3.1 . SUBJEKTY  | ....12              |
| 3.1.1. Fibroblastový růstový faktor 23, matrix-metaloproteinázy a kardiovaskulární anamnéza u nemocných s CKD 1-5. Průřezová studie.  | ....12              |
| 3.1.2. Placentární růstový faktor, matrix-metaloproteinázy, Extracelulární nově identifikovaný RAGE vazebný protein a echokardiografické parametry u CKD 2-4. Prospektivní observační studie.       | ...12               |
| 3.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA  | ...13               |
| 3.3. ECHOKARDIOGRAFIE   | ...13               |
| 3.4. STATISTICKÁ ANALÝZA  | ...14               |
| 4. VÝSLEDKY   | ...14               |
| 4.1. Fibroblastový růstový faktor 23, matrix-metaloproteinázy a kardiovaskulární anamnéza u nemocných s CKD 1-5. Průřezová studie. Nezávislé korelace.  | ...14               |
| 4.2. Placentární růstový faktor , matrix-metaloproteinázy, Extracelulární nově identifikovaný RAGE vazebný protein a echokardiografické parametry u osob s CKD 2-4. Prospektivní observační studie. | .....17             |
| 4.3. SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ   | .....20             |
| 5. DISKUSE  | .... 20             |
| 5.1 Fibroblastový růstový faktor 23, matrix-metaloproteinázy a kardiovaskulární anamnéza osob s CKD 1-5. Průřezová studie.  | .....20             |
| 5.2. Placentární růstový faktor , matrix-metaloproteinázy, Extracelulární nově identifikovaný RAGE vazebný protein a echokardiografické parametry osob s CKD 2-4. Prospektivní observační studie.   | .....21             |
| 6. ZÁVĚRY   | .....23             |
| 7. POUŽITÁ LITERATURA   | ...24               |
| 8. SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA  | ...26               |

## Abstrakt:

**Úvod:** Vysoké kardiovaskulární riziko u pacientů s chronickým onemocněním ledvin je částečně způsobeno poruchou minerálové rovnováhy, mikrozánětem a oxidačním stresem. Pacienti s CKD kumulují tradiční i netradiční KV rizikové faktory. Mezi netradiční markery KV rizika patří i fibroblastový růstový faktor 23 (FGF23), matrix-metaloproteinázy a placentární růstový faktor. FGF23 je fosfaturický hormon a inhibitor syntézy kalcitriolu, je asociován s cévními kalcifikacemi. Matrix-metaloproteinázy (MMP-2, MMP-9), jsou proteolytické a prozánětlivé enzymy, přispívající k remodelaci myokardu. Placentární růstový faktor (PIGF) je proangiogenní cytokin, který je ve zvířecím modelu spojen s hypertrofií levé komory. Hladiny FGF23, MMPs i PIGF jsou u CKD nemocných zvýšené.

**Cíl:** Cílem naší práce bylo popsat dynamiku změn vybraných nových biomarkerů KV rizika (FGF23, MMP-2, MMP-9 a PIGF) v různých stádiích CKD 1-5 a popsat jejich asociace s tradičními markery KV rizika. Dále jsme zjišťovali, zda existuje vztah mezi těmito markery a echokardiografickými parametry u nemocných s CKD stádia 2-4.

**Metody:** Do průřezové studie jsme zahrnuli 80 nemocných s CKD stádia 1-5 a 44 zdravých kontrol. V další, prospektivní studii, jsme sledovali 62 nemocných s CKD 2-4, po průměrnou dobu 36±10 měsíců. K detekci nezávislých korelací byla použita multivariantní regresní analýza. Hladiny FGF23, MMP-2, MMP-9 a PIGF byly měřeny metodou ELISA.

**Výsledky:** V průřezové studii byly hladiny FGF23 a MMP-2 vyšší u CKD nemocných než u kontrol. Byly zjištěny nezávislé korelace mezi hladinou FGF23 a MMP-2, mezi FGF23 a parathormonem, mezi MMP-2 a fosfatémií, inverzní korelace mezi FGF23 a kalcitriolem. FGF23 bylo vyšší u osob s anamnézou KV onemocnění. V prospektivní studii byl sledován vývoj echokardiografických parametrů u CKD 2-4. Počáteční vs. konečné parametry byly následující: zvýšení hmotnosti levé komory (LVMI) u 29% vs. 37,1% nemocných, diastolická dysfunkce LK u 74,1% vs. 75,8% nemocných. Byly zjištěny následující nezávislé korelace: LVMI s hladinou PIGF, cholesterolu, BNP, sérovým kreatininem a krevním tlakem. Hladina EN-RAGE korelovala s rozměrem levé síně a inverzně s poměrem E/A.

**Závěry:** Naše data u nemocných s CKD 1-5 ukazují na nezávislou korelaci hladin FGF23 s MMP-2 a MMP-2 s fosfatémií. Hladiny FGF23 byly vyšší u osob s anamnézou KV onemocnění. Hladina PIGF nezávisle koreluje s hmotností LK u nemocných s CKD 2-4, zatímco hladina EN-RAGE koreluje těsněji s diastolickou dysfunkcí levé komory. Naše data svědčí pro úzkou souvislost minerálové dysbalance a zánětu s KV anamnézou nemocných s CKD. Není však jasné, zda jde o kauzální souvislost a zda terapeutická modulace hladin popsaných biomarkerů může zmírnit KV riziko u této populace.

### Short summary:

**Background:** High cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease is partly due to mineral dysbalance, microinflammation and oxidative stress. CKD patients accumulate traditional and non-traditional CV risk factors. Fibroblast growth factor 23 (FGF23), matrix-metalloproteinases (MMPs) and placental growth factor (PIGF) belong among non-traditional markers of CV risk. FGF23 is a phosphaturic hormone and inhibitor of calcitriol synthesis. It is associated with vascular calcification. Matrix-metalloproteinases are proteolytic, proinflammatory enzymes, contributing to myocardial remodeling. PIGF is a proangiogenic cytokine that is associated with LV hypertrophy in animal model. Plasmatic FGF23, MMPs and PIGF are elevated in CKD. **Aim:** We aimed to describe dynamic changes between several novel biomarkers of CV risk (FGF23, MMP-2, MMP-9 and PIGF) in CKD stages 1-5, to describe their mutual correlations and possible association with traditional CV risk markers. We studied possible association of laboratory and echocardiographic parameters in patients with CKD stages 2-4.

**Methods:** In a cross-sectional study we evaluated 80 patients with CKD 1-5 and 44 healthy controls. In a prospective study we followed 62 patients with CKD 2-4 for an average study period of 36±10 months. We used multivariate regression analysis to detect independent correlations. FGF23, MMP-2, MMP-9 and PIGF serum levels were assessed by ELISA method.

**Results:** In a cross-sectional study, plasmatic FGF23 and MMP-2 were higher in CKD patients versus controls. We detected following independent correlations: plasmatic FGF23 with MMP-2, plasmatic FGF23 with parathormone and inversely with calcitriol; MMP-2 with phosphate levels. Plasmatic FGF23 was higher in patients with CV disease history. In the prospective study, we examined echocardiographic parameters in CKD 2-4. Basic versus final measurement showed the following: increased left ventricular mass index (LVMI) in 29% versus 37.1% patients, LV diastolic dysfunction in 74.1% versus 75.8% patients. We detected the following independent correlations: LVMI was associated with PIGF levels, total cholesterol, BNP levels, systolic BP and serum creatinine levels. EN-RAGE was associated with left atrial diameter and inversely with E/A ratio.

**Conclusions:** Our data in patients with CKD 1-5 show independent association between FGF23 and MMP-2 levels. MMP-2 was associated with phosphate levels. We detected a correlation of plasmatic PIGF with LVMI in patients with CKD 2-4, whereas plasmatic EN-RAGE correlated with LV diastolic dysfunction. Our data show a tight association of mineral dysbalance and inflammation with CV history in CKD patients. However, no data exist so far to prove causality of these associations. There is insufficient data about possible positive effect of therapeutic modulation of these biomarkers on CV risk in CKD population.

### Seznam zkratk:

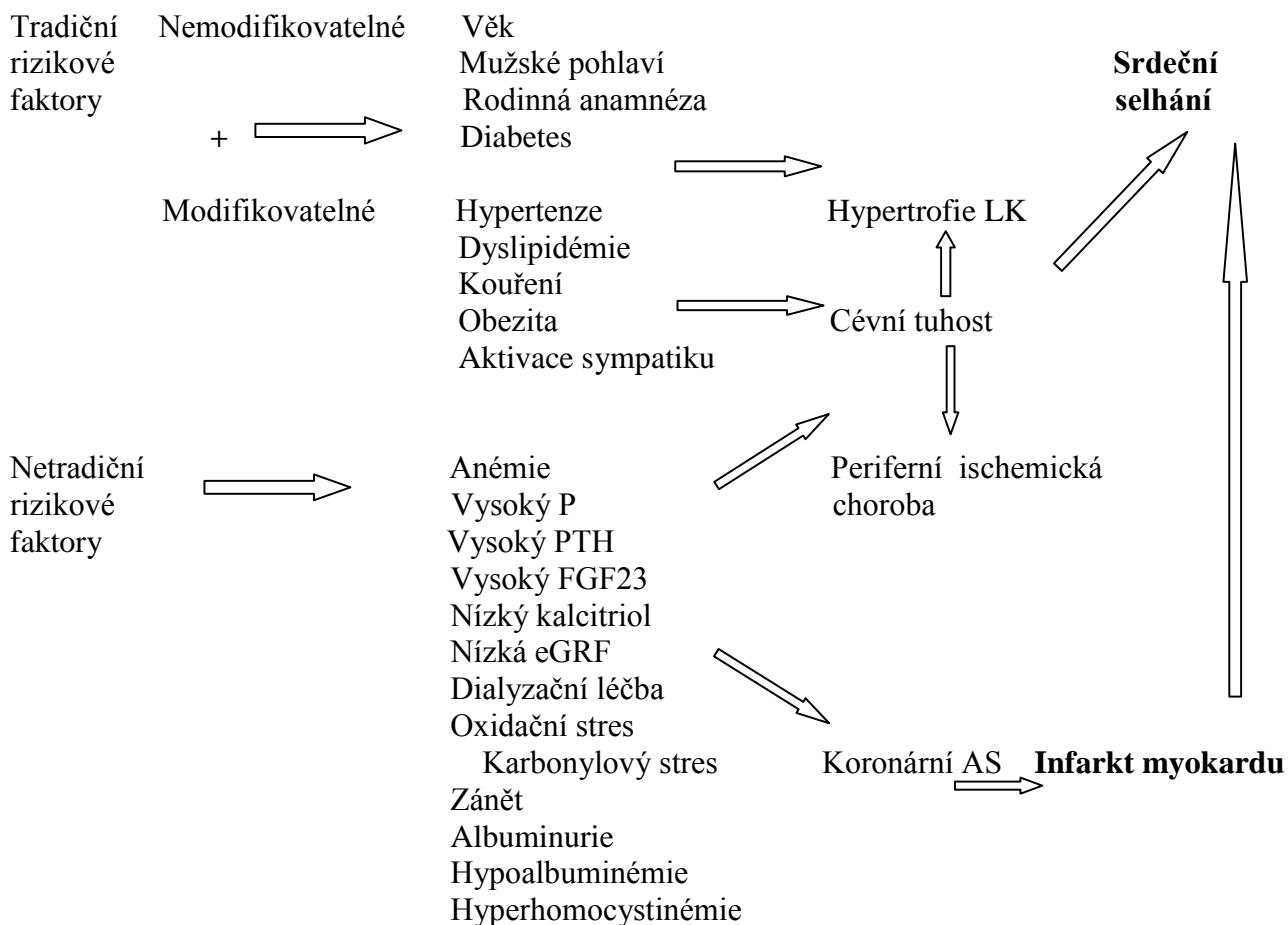
|   |  |
|---|--|
| 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D;   | ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay;  |
| ACE, angiotensin-konvertující enzym;                                      | eNOS, endoteliální NO syntáza;   |
| ACEI, inhibitory ACE;   | EN-RAGE, Extracelulární nově identifikovaný RAGE-vazebný ligand;                                   |
| ADMA, asymetrický dimethylarginin;  | ESRD, konečné stádium onemocnění ledvin;   |
| AGEs, produkty pokročilé glykace;   | FGF23, fibroblastový růstový faktor 23;  |
| Ach, acetylcholin;  | FRAP, Fe redukující kapacita plazmy;   |
| ALEs, produkty pokročilé lipoxidace ;                                     | GOLD, glyoxal-lysin dimer ;  |
| AMK, aminokyseliny;   | GSA, glutathion;   |
| ANCA, protilátky proti cytoplazmě neutrofilů;                             | HbA1c, glykovaný hemoglobin;   |
| Ang II., angiotensin II. ;  | HD, hemodialýza, hemodialyzování;  |
| ANP, atriální natriuretický peptid;                                       | HLK, hypertrofie levé komory;  |
| AOPP, produkty pokročilé oxidace proteinů ;                               | CHRI, chronická renální insuficience;  |
| ARBs, blokátory receptoru pro Angiotensin II;                             | ICAM-1, intracelulární adhezní molekula;   |
| AS, ateroskleróza, aterosklerotický;                                      | IgA, Imunoglobulin A;  |
| BMI, body mass index;   | ICHDK, ischemická choroba dolních končetin;  |
| BNP, natriuretický peptid B;  | ICHS, ischemická choroba srdeční;  |
| BSA, plocha tělesného povrchu;  | IMT, karotická „intima-media thickness“ ;  |
| Ca-P, kalciofosfátový;  | IR, inzulinová rezistence;   |
| CKD, chronické onemocnění ledvin;   | IVSd, tloušťka interventrikulárního septa v diastole;  |
| CKD-MBD, chronické onemocnění ledvin-choroba kostní a minerálová;         | KDIGO; Kidney Disease Improving Global Outcomes (Opatření zlepšující prognózu onemocnění ledvin) ; |
| CML, karboxymethyllysin   | KRS, kardiorenální syndromy;   |
| CMP, cévní mozková příhoda;   | KV, kardiiovaskulární;   |
| cTnI, srdeční troponin I;   | KV, kardiiovaskulární;   |
| DD, diastolická dysfunkce;  | LAD, rozměr levé síně;   |
| DM, diabetes mellitus;  | LDL, low-density lipoprotein;  |
| DT, decelerační čas;  | LK, levá komora;   |
| DTE-MI, decelerační čas na mitrální chlopni;                              | LV, left ventricle (levá komora);  |
| E/A ratio, poměr mezi časnou (E) a pozdní (A) komorovou plnicí rychlostí; | LVEDV, end-diastolický objem levé komory;  |
| EBCT, výpočetní tomografie s elektronovými paprsky;                       | LVEF, ejekční frakce levé komory;  |
| ECLIA, elektrochemilumiscenční imunoesej;                                 | LVESV, end-systolický objem levé komory;   |
| ECM, extracelulární matrix;   | LVH, hypertrofie levé komory;  |
| eGFR, odhadovaná glomerulární filtrace (ml/s) ;                           |  |
| EGFR, receptor pro epidermální růstový faktor;                            |  |

LVMI, hmotnostní index levé komory;  
 MAPK, mitogen activated protein kinase;  
 MDRD, modification of diet in renal disease (úprava diety u onemocnění ledvin);  
 MIA, malnutrition-inflammation-atherosclerosis (malnutrice-záněť ateroskleróza);  
 MICS, malnutrition-inflammation complex syndrome (komplexní syndrom malnutrice-záněť);  
 miRNA, mikro-ribonukleová kyselina;  
 MK, mineralokortikoidní;  
 MMP-2, matrix-metaloproteináza- 2  
 MMP-9, matrix-metaloproteináza-9;  
 MMPs, matrix-metaloproteinázy;  
 MOLD, methylglyoxal-lysine dimer;  
 MPO, myeloperoxidáza;  
 MSCT, multislice (vícevrstvá) výpočetní tomografie;  
 MW, molekulární hmotnost;  
 NF- $\kappa$ B, nukleární faktor-kappa B;  
 NGAL, gelatináza neutrofilů spojená s lipokalinem;  
 NKF-DOQI, National Kidney Federation – Kidney Dialysis Outcomes (Národní federace pro ledviny-dialyzační výsledky);  
 NO, oxid dusnatý;  
 NOS, NO-syntáza;  
 NYHA, New York Heart Association;  
 OS, oxidační stres;  
 PAI-1, inhibitor aktivátoru plasminogenu 1 ;  
 PAPP-A, s těhotenstvím spojený protein A;  
 PD, peritoneální dialýza;  
 PEM, protein-energetická malnutrice;  
 PEW, Protein Energy Wasting (protein-energetická malnutrice);  
 PIGF, Placentární růstový faktor;  
 PMNs, polymorfonukleáry;  
 PRIMO, studie vlivu parikalcitolu na kardiovaskulární morbiditu u CKD stádia 3-4;  
 PTH, parathormon;  
 PU, proteinurie;  
 PWTd, tloušťka zadní stěny v diastole;  
 PWV, rychlost pulsové vlny) ;  
 RAAS, systém renin-angiotenzin-aldosteron;  
 RAGE, receptor pro produkty pokročilé glykace;  
 RANKL, aktivátor receptoru pro nukleární faktor-kappa B;  
 RCOs, reaktivní karbonyly;  
 RIA, radioimunoanalýza;  
 ROC, receiver operating characteristic;  
 ROS, reaktivní produkty kyslíku;  
 RRT, náhrada funkce ledvin;  
 RWT, relativní tloušťka stěny;  
 SHARP, study of heart and kidney protection;  
 SHPT, sekundární hyperparatyreóza;  
 SOD, superoxiddismutáza;  
 SWTd, tloušťka septa v diastole;  
 TACE, TNF- $\alpha$ -konvertující enzym;  
 TAG, triacylglyceroly;  
 TGF $\beta$ 1, transformující růstový faktor beta 1;  
 TIMPs, tkáňový inhibitor metaloproteinázy;  
 TK, krevní tlak;  
 TNF, Tumor nekrotizující faktor;  
 LVEDD, end-diastolický rozměr levé komory;  
 VC, vascular calcification (cévní kalcifikace);  
 VCAM-1, adhezivní molekula cévních buněk;  
 VEGF, endoteliální cévní růstový faktor;  
 VDR, vitamin D receptor;  
 VDRA, agonisté receptoru pro vitamin D;  
 VSMCs, cévní hladké svalové buňky;

## 1. ÚVOD

Pacienti s chronickým onemocněním ledvin mají až 20x vyšší KV riziko oproti běžné populaci. Příčinou je zřejmě kumulace tradičních a CKD specifických rizikových faktorů. Hlavními rizikovými faktory u této populace jsou: hypertenze, hyperreaktivita RAAS, anémie, retence vody a sodíku, endoteliální dysfunkce, dysbalance minerálů a vitamínu D, mikrožánět a oxidační stres. Probíhá výzkum biomarkerů, které by mohly spojovat CKD a KV onemocnění, mezi ně patří i placentární růstový faktor (PIGF), extracelulární nově identifikovaný RAGE-vazebný protein (EN-RAGE), matrix-metaloproteinázy, fibroblastový růstový faktor 23 (FGF23), vitamin D a parathormon (PTH). Typickými KV komplikacemi u CKD jsou: cévní kalcifikace, akcelerovaná ateroskleróza, hypertrofie levé komory (HLK), myokardiální fibróza a náhlá smrt (1, 2). Kardiovaskulární systém a ledviny jsou úzce provázány a primární změny v jednom systému často poškodí druhý systém. Současná dysfunkce srdce a ledvin je označována jako „kardiorenální syndrom“ (KRS) (2).

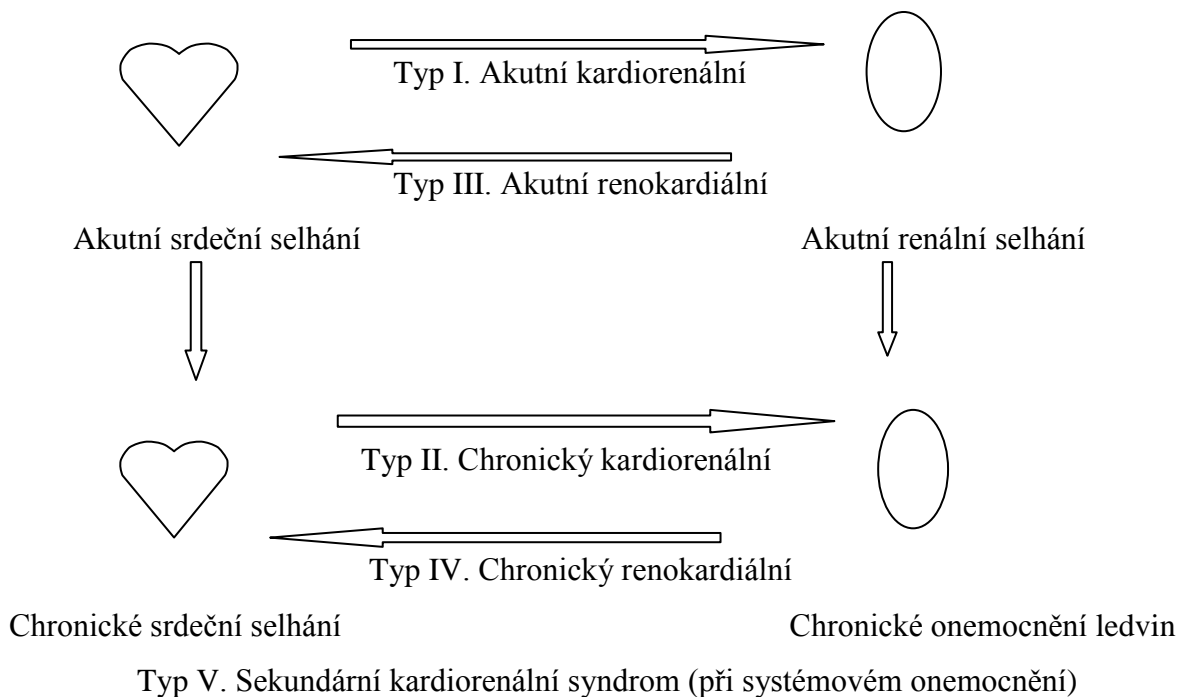
**Obrázek 1: Faktory KV chorob u ESRD nemocných.**





Kalcifikace cévní intimy resp. média (VC) vedou k okluzi, resp. ztluštění stěny tepen. Prevalence VC roste s poklesem GFR, stupeň VC koreluje s tuhostí tepen, hypertenzí a HLK, je prediktorem mortality. Minerálová depozice ve stěně tepen je spojena s tzv. CKD-MBD (porucha kostní a minerálová). V patofyziologii VC se uplatňuje precipitace fosfátů a kalcia (minerální krok) a buněčný krok zahrnující apoptózu, degradaci elastinu a osteochondrogenní diferenciaci. Mezi promotéry VC patří: aktivátor receptoru pro NF kappa B ligand (RANKL), hyperfosfatémie, hyperkalcémie, leptin, AGEs, oxidační stres, FGF23. Inhibitory VC jsou: osteoprotegerin, fetuin-A, osteopontin, magnésium, pyrofosfát, klotho, osteokalcin. Ateroskleróza je zánětlivý proces zvyšující intracelulární akumulaci lipidů. Cytokiny poškozují endotel a spolu s metaloproteinázami podporují rupturu plátu (3, 4).

**Obrázek 2: Kardiorenální syndromy**



Hypertrofií levé komory (HLK) trpí 72-89% pacientů s CKD 3-5, začíná v časných stádiích CKD a její prevalence stoupá s poklesem GFR. HLK je původně kompenzačním mechanismem, který ale zhoršuje prognózu pacientů. Excentrická forma vzniká volumovým přetížením, koncentrická forma je důsledkem hypertenze, je zhoršována anémií, hyperparatyreózou a zvýšením angiotensinu II (4). Kardiomyopatie u CKD je souhrnem HLK, intersticiální fibrózy, ztuhnutí arteriol a kapilárního deficitu (7, 8). CKD je nezávislým prediktorem LVMI, což zřejmě souvisí s prohypertrofickými faktory (aldosteron) (12, 13). Diastolická dysfunkce (DD) je u CKD běžná, způsobuje arytmie, snižuje práh pro vznik plicního edému a zhoršuje prognózu. Jsou popsány tři typy DD: 1. Porucha relaxace 2. Pseudonormalizace a 3. Restriktivní plnění LK. Index pulsního

tlaku koreluje s diastolickou funkcí stejně jako rozměr levé síně, který je prediktorem KV úmrtí i progrese CKD (6, 10).

### **Netradiční (CKD specifické) faktory kardiovaskulárního rizika**

Porucha minerálového a kostního metabolismu (CKD-MBD) zahrnuje: abnormality metabolismu kalcia, fosforu, PTH, vitaminu D, kostního obratu a mineralizace, kalcifikace cév a měkkých tkání. Cévní manifestace CKD-MBD začíná ztuhnutím cév a zvýšením karotické IMT. Elevace hladin fosforu, kalcia a PTH se pojí s vyšší mortalitou, HLK, oxidačním stresem a mikrozánětem. Fosfáty jsou induktory osteochondrogenní diferenciaci VSMCs (5, 17, 19). FGF23 je nejspíše klíčovým a nejčasnějším sérovým markerem CKD-MBD. Je tvořen hlavně osteocyty v reakci na zvýšenou fosfatémií, PTH, vitamin D, leptin. Hlavní úlohou FGF23 je zvýšení fosfaturie a inhibice tvorby aktivního vitaminu D, zvyšuje retenci sodíku a brání degradaci Ang II. K jeho působení je nezbytný transmembránový koreceptor Klotho (8,20, 21). Klothodeficitní a FGF23-deficitní myši vykazují akceleraci aterosklerózy, VC, oxidační stres, renální fibrózu a zkrácené dožití. Podání FGF23 potkanům zhoršilo HLK. Byla popsána korelace mezi zánětlivými cytokiny a FGF23 (23, 29). Aktivní 1,25 (OH) vitamin D je hormon působící cestou jaderného receptoru VDR v mnoha typech buněk. Kalcitriol je kardio- a renoprotektivní díky svým protizánětlivým a RAAS blokujícím účinkům. Deficit kalcitriolu u CKD se pojí s tuhostí cévní stěny, HLK, sekundární hyperparatyreózou. Podle epidemiologických studií léčba aktivátory receptoru pro vitamin D (VDRAs) zlepšuje přežití CKD nemocných (25, 26).

Oxidační stres (OS) je nerovnováha mezi působením reaktivních forem kyslíku (ROS) a přirozeným antioxidačním systémem jejich deaktivace. U CKD dochází k retenci cytokinů i ROS, prooxidačně působí uremické toxiny, acidóza, zánět, léčba Fe, srdeční selhání, volumové přetížení. Antioxidační mechanismy jsou deficitní. OS vede ke vzniku produktů rezistentních k proteolýze, výsledkem je apoptóza/nekróza buněk. OS je rizikovým faktorem progrese CKD, KV chorob, malignit, aterosklerózy, ischemicko-reperfučního poškození. ROS jsou nestabilní, proto se k diagnostice používá měření hladin antioxidantů a poškození biomolekul. OS a zánět jsou vzájemně propojeny. ROS jsou tvořeny fagocyty po zánětlivé stimulaci. OS aktivuje matrix-metaloproteinázy (31, 33). Chronický zánět vede ke katabolismu a zvyšuje mortalitu. Až 50% HD nemocných má zvýšené hodnoty zánětlivých markerů. OS i zánět se podílejí na endoteliální dysfunkci. Endotel je největším zdrojem i cílem ROS, je zde produkován NO pomocí NO syntázy. Ve vývoji kardiomyopatie hrají ústřední roli cytokiny (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6), které poškozují kardiomyocyty (32). Karbonylový stres je proces glykoxidace s akumulací reaktivních karbonylů (RCOs) a AGEs/ALEs v plazmě a tkáních. Jejich hladiny jsou u CKD zvýšené. AGEs se vážou na specifický receptor (RAGE) na povrchu buněk, spouští tvorbu ROS, aktivaci faktoru NF- $\kappa$ B, up-regulaci

cytokinů a adhezních molekul (36). Prozánětlivý EN-RAGE (S100A12) je secernován z granulocytů, je prediktorem cévní remodelace a kalcifikace. Solubilní sRAGE je kompetitivním inhibítorem vazby ligandů na RAGE, a tak může oslabit zánětlivou odpověď (35). K prevenci účinků ROS slouží přirozené antioxidační systémy, např.: superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza, vitamin E, vitamin C (31).

Placentární růstový faktor (PIGF) je proaterogenním cytokinem a členem rodiny pro-proliferativních endoteliálních růstových faktorů. Jde o 50-kDa heterodimer, složením podobný VEGF, je exprimován mj. v srdci, kostní dřeni, svalech. PIGF stimuluje angiogenezi v ischemických tkáních, atrahuje monocyty, reguluje růst endotelu a VSMCs, aktivuje hematopoetické kmenové buňky, zvyšuje zánět, permeabilitu cév, produkci TNF- $\alpha$ . V reakci na ischemii reguluje parakrinní spolupráci mezi srdečními buňkami, a tak koordinuje neoangiogenezi a remodelaci komor, kteřa je klíčová pro rozsah adaptační reakce (37). Matrix metaloproteinázy a PAPP-A (Pregnancy associated plasma protein A) jsou Zn-dependentní, prozánětlivé a proteolytické enzymy. Lze je nalézt mj. v plazmě a v nestabilním AS plátu. Degradují extracelulární matrix, podporují disrupci plátu, aterosklerózu, angiogenezi a srdeční remodelaci, jsou biomarkery renálního a KV poškození. Jejich zástupci jsou PAPP-A, MMP-2 a MMP-9. PAPP-A je glykoprotein, který aktivuje makrofágy a výdej cytokinů, jeho hladina stoupá v pozdních stádiích CKD, koreluje s rozsahem koronárních kalcifikací. Matrix- metaloproteinázy (MMPs) jsou endopeptidázy, syntetizované v endotelu, VSMCs a fibroblastech. Rovnováha mezi MMPs a jejich inhibitory je klíčová pro regulaci zánětu, ne vaskularizace i apoptózy. MMPs degradují ECM v reakci na ischemicko-reper fúzní poškození. MMP-2 indukuje remodelaci glomerulů, tubulů a cév a podílí se na progresi CKD a KV chorob (38).

Protein-energetická malnutrice (PEM neboli MIA syndrom, malnutrition-inflammation-atherosclerosis) je stav deplece zásob proteinů a /nebo tuků. U ESRD je PEM častá a je korelátém vysoké mortality. PEM je považována za důsledek chronického zánětu. Syndrom MIA je zřejmě příčinou zrychlené aterosklerózy a tzv. reverzní epidemiologie KV rizika, kdy jsou konvenční rizikové faktory (obezita, hypercholesterolemie a vyšší TK) spojeny s lepší prognózou (15). Hladiny natriuretických peptidů (BNP a NT-proBNP) pomáhají v diagnóze srdečního selhání a jsou prediktory KV příhod. Jejich hladiny u CKD jsou zvýšené i při absenci symptomů srdečního selhání, zřejmě z důvodu zvýšeného napětí myokardu při hypertenzi, HLK, subklinické ischemii a srdeční fibróze (39). Troponiny (hs-cTnI/T) korelují se závažností ICHS, HLK a horší prognózou, ale specifická a sensitivita troponinů v diagnostice akutní koronární příhody u CKD je otazná. Elevace troponinů u CKD může být vysvětlena remodelací myokardu (8). Anémie je u CKD častá a zvyšuje riziko HLK, srdečního selhání a progresu CKD (2). Matrix gla protein syntetizovaný v médii tepen, je vitamin K-dependentním inhibítorem krystalizace kalcia a fosfátů. Deficit

vitaminu K koreluje s výskytem VC (5). Biomarkery by měly přispět k časně identifikaci KRS, k léčbě a monitoraci efektu léčby, k odhalení nových patofyziologických cest.

## 2. CÍLE STUDIE

Hladiny FGF23, MMPs i PIGF jsou u pacientů s CKD zvýšené. Hladina FGF23 koreluje s výskytem cévních kalcifikací, KV onemocnění a nepříznivou prognózou ESRD nemocných (21). MMPs hrají roli ve vývoji VC, remodelaci myokardu a destabilizaci AS plátu (38). Placentární růstový faktor (PIGF) je ve zvířecím modelu spojován s HLK (37). Dosud nebyla publikována souvislost PIGF s vývojem HLK a/nebo diastolické dysfunkce u nemocných s CKD. Málo je známo o echokardiografických změnách u pacientů s časnými stádii CKD.

Proto jsme stanovili tyto cíle:

1. v průřezové studii u nemocných s CKD 1-5, dosud nezávislých na dialýze
  - a) zjistit, zda existuje asociace mezi hladinou FGF23, parametry Ca-P metabolismu a matrix-metaloproteinázami
  - b) zjistit, zda existuje asociace mezi anamnézou KV komplikací a hladinami FGF23, MMPs a parametry Ca-P metabolismu
2. v prospektivní observační studii u nemocných s CKD stádii 2-4
  - a) posoudit, zda u této populace hladina PIGF predikuje zvýšení hmotnostního indexu levé srdeční komory
  - b) zjistit, zda existuje korelace hladin PIGF a dalších KV rizikových faktorů s echokardiografickými parametry CKD nemocných

## 3. MATERIÁL A METODY

### 3.1. SUBJEKTY

Studie byly schváleny Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Písemný informovaný souhlas byl získán od všech zúčastněných.

#### 3.1.1. FGF23, matrix-metaloproteinázy a KV anamnéza u osob s CKD 1-5. Průřezová studie.

Do studie jsme zařadili 80 ambulantních pacientů (36% mužů, průměrný věk: 53±14 let) v různých stádiích CKD. Kontrolní skupinu tvořilo 44 věkově odpovídajících zdravých osob (45% mužů, průměrný věk: 58±10 let). Laboratorní charakteristiky souboru prezentuje Tabulka 1. Etiologie CKD byla následující: ANCA vaskulitidy, hypertenzní nefropatie, lupusová nefritis, IgA nefritis, diabetická nefropatie, membranózní nefropatie, fokálně segmentální glomeruloskleróza, onemocnění minimálních změn, amyloidóza. Pacienti byli rozděleni do 4 podskupin CKD, dle eGFR (MDRD) : stádium 5 (eGFR <15 ml/min), stádium 4 (eGFR 15-30 ml/min), stádium 3 (30-60

ml/min), stádium 1+ 2 (eGFR > 60 ml/min). Anamnéza KV chorob byla převzata z lékařských záznamů a zahrnovala ICHS, ICHDK a / nebo CMP.

### **3.1.2. PIGF, matrix-metaloproteinázy, EN-RAGE a echokardiografické parametry u osob s CKD 2-4. Prospektivní observační studie.**

V období 2004-2009 bylo postupně zařazeno 76 ambulantních pacientů (60% mužů, průměrný věk 62±15 let) s CKD 2-4, kteří byli poté sledováni průměrně 36 ± 10 měsíců. Laboratorní a echokardiografické parametry byly sledovány prospektivně. Data byla odebrána u každého pacienta 2–3 krát, v nejkratším intervalu 12 měsíců. Během sledovaného období 8 nemocných zemřelo a 6 ze studie vystoupilo. Finální data byla zpracována u 62 pacientů, kteří sledování dokončili. CKD bylo definováno jako pokles eGFR<60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>. Etiologie CKD byla následující: ischemická nefropatie, IgA nefritis, chronická pyelonefritis, hypertenzní nefropatie, diabetická nefropatie, ANCA vaskulitis, lupusová nefritis a jiné příčiny. Anamnéza KV chorob byla převzata z lékařských záznamů a zahrnovala ICHS, ICHDK a / nebo CMP.

### **3.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA**

Venózní krevní vzorky byly odebrány nalačno. Krev byla centrifugována a sérum bylo zmrazeno na -80 °C. Sérové koncentrace PAPP-A byly stanoveny pomocí metody TRACE. Koncentrace kalcitriolu v séru byla stanovena pomocí <sup>125</sup>I RIA. Sérové koncentrace PIGF, MMP-2, MMP-9, sRAGE, EN-RAGE, ctFGF23 byly měřeny metodou ELISA. Biointaktní parathormon byl stanoven pomocí ECLIA. Koncentrace BNP a troponinu I (cTnI) byly stanoveny chemiluminiscenční metodou. Rutinní laboratorní vyšetření byla provedena standardními metodami na automatických analyzátozech. Funkce ledvin (eGFR) byla spočítána pomocí MDRD vzorce.

### **3.3. ECHOKARDIOGRAFIE**

Vyšetření bylo provedeno cestou standardních echokardiografických přístupů s použitím M-mode zobrazení a dopplerovských modalit. Hmotnost LK byla stanovena pomocí standardního vzorce a indexována na pacientovu výšku<sup>2.7</sup>. Hypertrofie LK byla definována jako hmotnostní index levé komory (LVMI) >46.7 g/m<sup>2.7</sup> u žen a >49.2 g/m<sup>2.7</sup> u mužů. Spolu s relativní tloušťkou stěny LK (RWT), byla použita k charakteristice geometrie LK, kterou lze rozdělit do 4 kategorií: normální geometrie LK, koncentrická remodelace LK, excentrická hypertrofie, koncentrická hypertrofie LK. Objemy LK byly použity k výpočtu ejekční frakce LK. Diastolická funkce byla hodnocena pomocí obrazu transmitrálního toku s použitím parametrů pulmonárního venózního influxu. Plnění LK jsme popsali jako: normální, poruchu relaxace, pseudonormální plnění nebo restriktivní plnění. Rozměr levé síně (LAD) byl indexován na tělesný povrch.

### 3.4. STATISTICKÁ ANALÝZA

Byl použit software InStat GraphPad, Statistica software verze 5.5 a MedCalc 9.3. Data prezentujeme jako průměr +/- SD pro kontinuální proměnné a jako procenta pro kategorické proměnné, v případech nenormální distribuce jako mediány a mezikvartilové rozpětí. Srovnání byla provedena pomocí párových t testů pro proměnné s normální distribucí a Wilcoxonovým testem pro proměnné s nenormální distribucí. Proměnné s nenormální distribucí byly dle potřeby ln-transformovány. Asociace mezi parametry byly stanoveny pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Všechny proměnné, které byly významně asociovány s echokardiografickými parametry, byly zahrnuty do multivariantní regresní. Kvalitativní proměnné byly analyzovány pomocí Kruskal-Wallisova testu. Ke srovnání vstupních a finálních echokardiografických nálezů byl použit Chi-Square Test for Trend (Tabulka 2). Výsledky byly považovány za statisticky významné při  $p < 0.05$ .

## 4. VÝSLEDKY

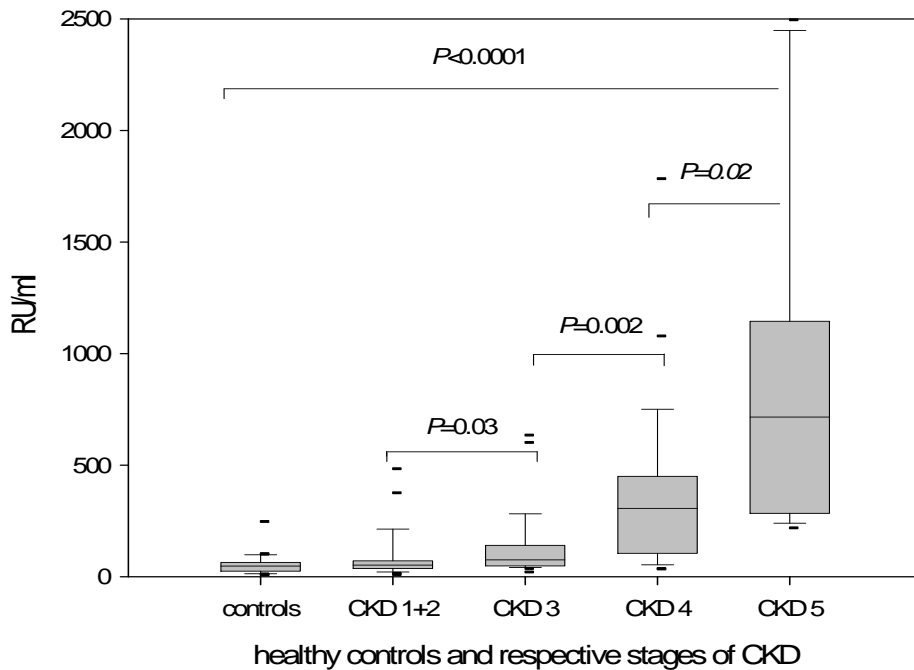
### 4.1. FGF23, matrix-metaloproteinázy a KV anamnéza u osob s CKD 1-5. Průřezová studie. Nezávislé korelace.

Hladiny FGF23 v jednotlivých stádiích CKD a u kontrol jsou uvedeny v Grafu 1. Změny sérových hladin zjištěné již ve stádiu CKD 2 (oproti kontrolám) byly následující: pokles s-albuminu, vzestup PTH a triacylglycerolů. Od stádia CKD 3 se snižovaly hladiny kalcitriolu, zatímco fosfatémie, FGF23, CRP rostly. Od stádia CKD 4 se zvyšoval CaxP součin. Ve stádiu CKD 5 došlo k elevaci hladin PAPP-A a MMP-2 (Graf 2). Pacienti s KV anamnézou měli vyšší hladiny FGF23, oproti nemocným bez této anamnézy (559 vs. 154 RU/ml), po adjustaci na eGFR a věk (Graf 3). Vyšší věk byl spojen s pozitivní KV anamnézou, vyšší hladinou FGF23, PAPP-A a PTH, naopak věk koreloval inverzně s hladinou kalcitriolu. Hladina FGF23 korelovala s fosfatémií. ale nikoli s frakční exkrecí fosfátů (FE-Pi). FE-Pi pozitivně korelovala s PTH. Hladina FGF23 nezávisle korelovala s hladinou MMP-2, kalcitriolu a PTH. Hladina MMP2 nezávisle korelovala s fosfatémií.

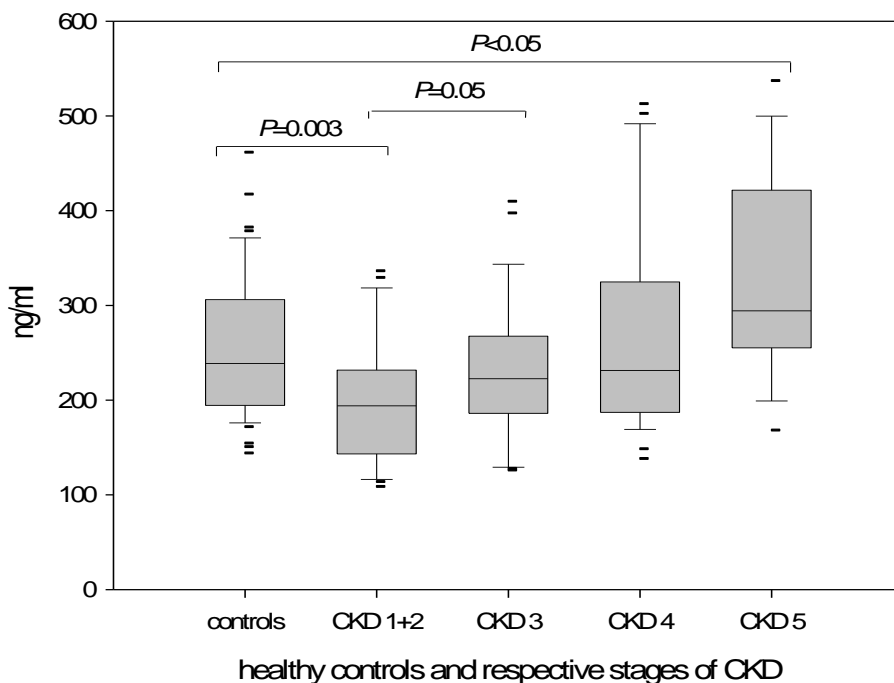
**Tabulka 1: Laboratorní charakteristiky studijní skupiny a kontrol. FGF23, matrix-metaloproteinázy a KV anamnéza u osob s CKD 1-5. Průřezová studie.**

| Proměnná +/- sd           | Kontroly   | CKD 1 - 5   | CKD 1 + 2   | CKD 3      | CKD 4      | CKD 5      | P:Anova CKD 1-5 |
|---------------------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|-----------------|
|                           |            | MDRD (ml/s) | 1.2+/-0.2   | 0.7+/-0.5  | 1.4+/-0.3  | 0.7+/-0.1  | 0.4+/-0.2       |
| FGF23 (RU/ml)             | 53+/-44    | 292+/-461   | 86+/-11     | 136+/-157  | 380+/-387  | 965+/-808  | p< 0.0001       |
| hsCRP (mg/l)              | 3.3+/-2.1  | 7.5+/-7.6   | 1.2+/-3     | 8.6+/-8.2  | 9.1+/-8    | 9.1+/-11   | ns              |
| PAPP-A (mIU/l)            | 9.4+/-2.3  | 11.3+/-9.4  | 8.5+/-2.5   | 10.1+/-5.2 | 12.5+/-9.6 | 19.6+/-18  | p< 0.03         |
| Kalcitriol (ng/ml)        | 41.9+/-15  | 20.3+/-14.7 | 35.6+/-16.8 | 16.8+/-12  | 14.3+/-9.4 | 7.7+/-5    | p< 0.001        |
| MMP-2 (ng/ml)             | 256+/-76   | 247+/-99    | 198+/-65    | 239+/-77   | 270+/-111  | 329+/-110  | p< 0.005        |
| Kalcium (mmol/l)          | 2.36+/-0.1 | 2.18+/-0.2  | 2.24+/-0.2  | 2.15+/-0.2 | 2.16+/-0.2 | 2.14+/-0.2 | p< 0.002        |
| Fosfáty (mmol/l)          | 1.1+/-0.2  | 1.3+/-0.4   | 1.1+/-0.2   | 1.4+/-0.4  | 1.4+/-0.3  | 1.6+/-0.3  | p< 0.0007       |
| PTH (pmol/l)              | 2.7+/-1.5  | 9.9+/-12.3  | 3.6+/-1.4   | 6.2+/-4    | 16.4+/-17  | 20.2+/-15  | p< 0.0001       |
| Cholesterol (mmol/l)      | 5.4+/-0.9  | 5.8+/-2.4   | 5.9+/-2.1   | 6.0+/-2.7  | 5.8+/-2.3  | 5.4+/-2.7  | ns              |
| HDL chol. (mmol/l)        | 1.7+/-0.3  | 1.5+/-0.5   | 1.7+/-0.6   | 1.5+/-0.4  | 1.5+/-0.5  | 1.4+/-0.5  | p< 0.04         |
| LDL chol. (mmol/l)        | 3.1+/-0.7  | 3.3+/-1.7   | 3.3+/-1.6   | 3.8+/-2.2  | 3.1+/-0.9  | 2.4+/-0.4  | p< 0.02         |
| Triacylglyceridy (mmol/l) | 1.3+/-0.7  | 2.1+/-1.2   | 1.9+/-1     | 2.1+/-1.1  | 2.3+/-1.5  | 2.1+/-1.1  | p< 0.01         |
| Albumin (g/l)             | 44+/-2.3   | 32+/-8.2    | 35+/-9      | 30+/-8     | 31+/-8.2   | 30+/-4.5   | p< 0.0001       |
| Hemoglobin (g/l)          | 142+/-10   | 113+/-20    | 133+/-15    | 110+/-18   | 102+/-13   | 101+/-9    | p< 0.0001       |

- **Graf 1: Sérové FGF23 v různých stádiích CKD a u zdravých kontrol**  
**FGF-23**



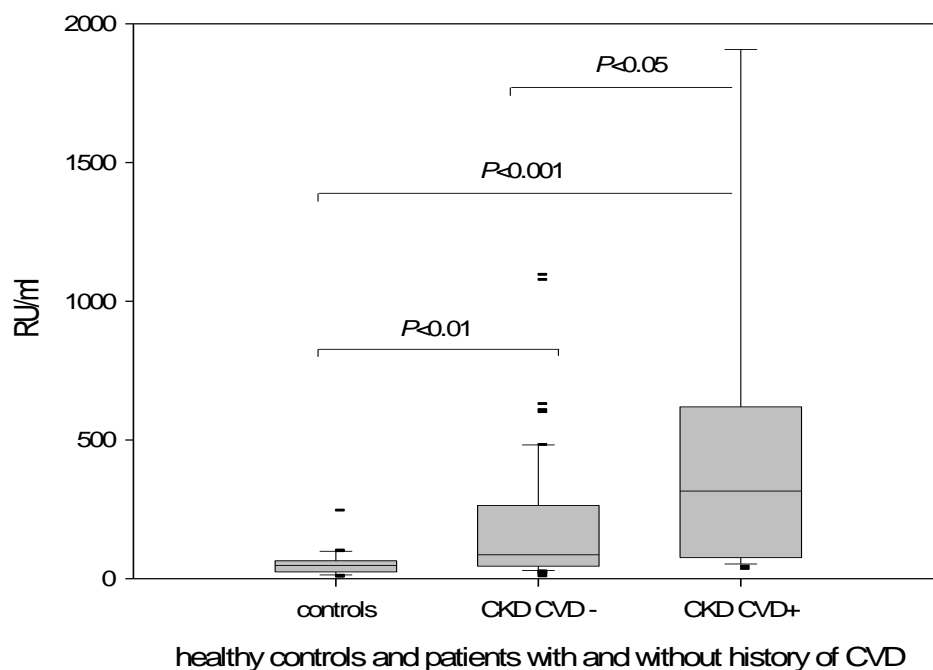
**Graf 2: Sérové MMP-2 v různých stádiích CKD a u zdravých kontrol**  
**MMP-2**





**Graf 3: FGF23 u kontrolních a CKD nemocných s a bez anamnézy KV chorob:**

FGF-23: history of CVD



#### 4.2. Placentární růstový faktor, matrix-metaloproteinázy, EN-RAGE a echokardiografické parametry u osob s CKD 2-4. Prospektivní observační studie.

Zvýšená hmotnost LK byla zjištěna u 29%, resp. 37.1% nemocných (na počátku resp. na konci sledování). 56.5%, resp. 43.5% pacientů mělo normální geometrii LK, 12.9%, resp. 21% splňovalo parametry koncentrické remodelace, 9.7%, resp. 9.7% mělo známky koncentrické hypertrofie a 21%, resp. 25.6% mělo známky excentrické hypertrofie. Normální diastolická funkce LK byla nalezena u 25.8%, resp. 24.2% pacientů, porucha relaxace LK u 43.5%, resp. 43.5% pacientů a pseudonormální charakter plnění LK zjištěn u 30.6%, resp. 32.3% pacientů. Nikdo nesplňoval kritéria restriktivní poruchy diastolického plnění LK. Nezávislé korelace echokardiografických parametrů, laboratorních markerů a TK jsou prezentovány v Tabulce 3. LVMI pozitivně koreloval s PIGF (Graf 4), BNP, s-kreatininem a sTK. Hladina BNP pozitivně korelovala s diametrem levé síně. Hladina EN-RAGE korelovala s diametrem levé síně a inverzně s poměrem E/A. Hladina PTH inverzně korelovala s EFLK. Nebyly zjištěny korelace mezi echokardiografickými parametry a hemoglobinem, FGF23 ani vitaminu D. Hladina PIGF nekorelovala s TK. Během sledovaného období, spolu s poklesem eGFR, byl zjištěn významný nárůst LVMI, rozměru levé síně (Tabulka 2), hladiny EN-RAGE, FGF23 a BNP, naopak byl zjištěn pokles EFLK, poměru E/A, s-albuminu, vitaminu D a hemoglobinu. Nebyly zjištěny změny v hodnotách TK. Anamnéza KV onemocnění byla přítomna u 50% nemocných. Tito nemocní měli

vyšší LVMI, vyšší s-kreatinin, triacylglyceridy, FGF23 a PAPP-A. Nemocní s KV anamnézou naopak měli nižší hladiny 25OHvitaminu D a nižší s-albumin oproti pacientům bez KV anamnézy.

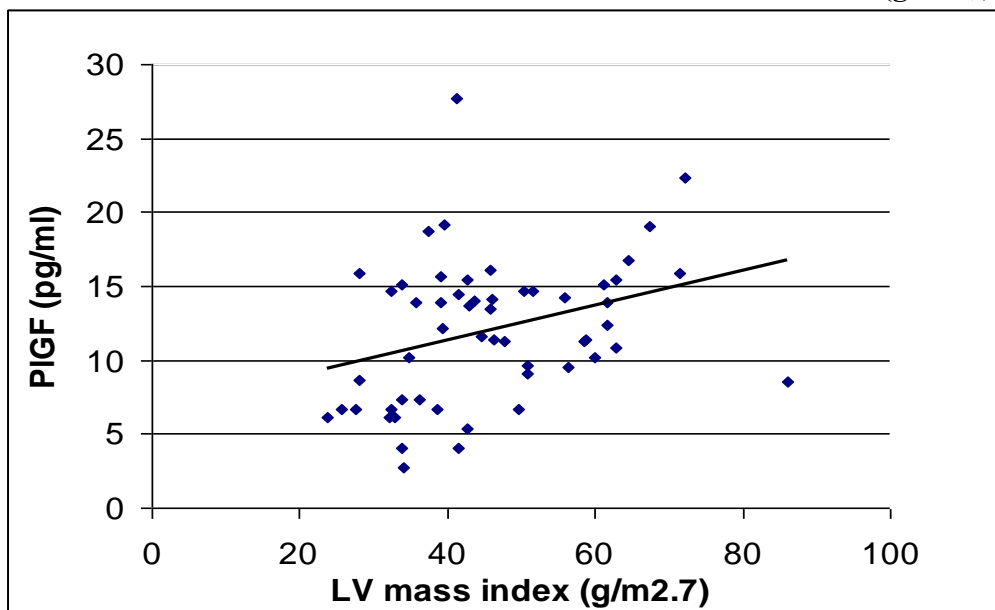
| <b>Tabulka 2: Echokardiografické charakteristiky (%) sledovaného souboru (n = 62)</b> |                |                                  |                                      |
|---|----------------|----------------------------------|--------------------------------------|
|   | <b>Vstupní</b> | <b>S odstupem 36 ± 10 měsíců</b> | <b>p (chi square test for trend)</b> |
| <b>Hmotnostní index LK (LVMI v g/ m<sup>2.7</sup>)</b>                                |                |                                  |                                      |
| Normální  | 71             | 62,9                             | p = 0.22 NS                          |
| Zvýšený   | 29             | 37,1                             |                                      |
| <b>Geometrie LK</b>   |                |                                  |                                      |
| Normální geometrie LK   | 56,5           | 43,5                             | p = 0.25 NS                          |
| Koncentrická remodelace   | 12,9           | 21                               |                                      |
| Koncentrická hypertrofie  | 9,7            | 9,7                              |                                      |
| Excentrická hypertrofie   | 21             | 25,8                             |                                      |
| <b>EFLK (%)</b>   |                |                                  |                                      |
| Normální  | 88,7           | 87,1                             | p = 0.68 NS                          |
| Snížená   | 11,3           | 12,9                             |                                      |
| <b>Rozměr levé síně (LAD v cm/ m<sup>2</sup>)</b>                                     |                |                                  |                                      |
| Normální  | 98,4           | 98,4                             | p = 1.00 NS                          |
| Zvýšený   | 1,6            | 1,6                              |                                      |
| <b>Diastolická funkce LK</b>  |                |                                  |                                      |
| Normální diastolická funkce LK  | 25,8           | 24,2                             | p = 0.96 NS                          |
| Porucha relaxace  | 43,5           | 43,5                             |                                      |
| Pseudonormální plnění LK  | 30,6           | 32,3                             |                                      |
| <b>E/A poměr</b>  |                |                                  |                                      |
| Pod 0.8   | 46,8           | 48,4                             | p = 0,06 NS                          |
| 0-8-1.5   | 50             | 40,3                             |                                      |
| Nad 2   | 3,2            | 11,3                             |                                      |
| <b>DTE-MI (ms)</b>  |                |                                  |                                      |
| Nad 200   | 38,7           | 62,9                             | p < 0.01                             |
| 160-200   | 37,1           | 27,4                             |                                      |
| Pod 160   | 24,2           | 9,7                              |                                      |

| Tabulka 3 : Nezávislé korelace laboratorních a echokardiografických parametrů (stepwise multiple regression) |           |           |           |           |           |           |           |     |            |          |          |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----|------------|----------|----------|
|  | LVM11     | LVM13     | LAD 1     | LAD 2     | LAD 3     | EF1       | EF2       | EF3 | E/A 1      | E/A 2    | E/A 3    |
| eGFR   | r = -0,31 | r = -0,37 | r = -0,25 | r = -0,37 | r = -0,41 | -         | -         | -   | r = 0,54   | r = 0,43 | r = 0,40 |
| MDRD   | p = 0,02  | p < 0,01  | p = 0,06  | p < 0,02  | p < 0,01  |           |           |     | p < 0,0001 | p < 0,01 | p < 0,01 |
| Sérový albumin   | r = -0,27 | -         | -         | r = -0,33 | r = -0,33 | -         | -         | -   | -          | -        | -        |
|  | p < 0,05  |           |           | p < 0,05  | p = 0,02  |           |           |     |            |          |          |
| Parathor mon   | -         | -         | -         | -         | -         | -         | r = -0,47 | -   | -          | -        | -        |
|  |           |           |           |           |           |           | p < 0,01  |     |            |          |          |
| EN-RAGE  | -         | -         | r = 0,35  | -         | -         | r = -0,26 | -         | -   | r = -0,34  | -        | -        |
|  |           |           | p < 0,01  |           |           | p < 0,05  |           |     | p = 0,01   |          |          |
| PIGF   | -         | r = 0,31  | -         | -         | r = 0,36  | -         | -         | -   | -          | -        | -        |
|  | -         | p < 0,02  |           |           | p < 0,01  |           |           |     |            |          |          |
| BNP  | r = 0,42  | r = 0,51  | r = 0,27  | r = 0,30  | r = 0,50  | -         | -         | -   | -          | -        | -        |
|  | p < 0,01  | p < 0,001 | p < 0,05  | p = 0,08  | p < 0,01  |           |           |     |            |          |          |
| Systolic ký TK   | -         | r = 0,31  | -         | -         | -         | -         | -         | -   | -          | -        | -        |
|  |           | p < 0,02  |           |           |           |           |           |     |            |          |          |

Každý parametr sériového echokardiografického měření je uvedený ve třech hodnotách (1: vstupní měření, 2: první kontrolní měření, 3: druhé kontrolní měření).

Zkratky: BNP mozkový natriuretický peptid, TK krevní tlak, E/A Poměr mezi časnou (E) a pozdní (atriální - A) rychlostí komorového plnění, EF ejekční frakce LK, EN-RAGE Extracelulární nově identifikovaný RAGE vazebný protein, DT „deceleration time“ na mitrální chlopni, LAD rozměr levé síně, LVM1 index hmotnosti levé komory, eGFR glomerulární filtrace, MDRD „modification of diet in renal disease“, PIGF placentární růstový faktor, r Pearsonův korelační koeficient.

**Graf 4: Korelace hladin PIGF a hmotnostního indexu LK ( $\text{g/m}^{2,7}$ ),  $r = 0,31$ ,  $p < 0,02$ .**



Použita finální data. PIGF: Placentární růstový hormon, LV: left ventricle (levá komora)

### 4.3. SHRnutí VÝSLEDKŮ:

#### 4.3.1. FGF23, matrix-metaloproteinázy a KV anamnéza u osob s CKD 1-5. Průřezová studie.

- a) Byla zjištěna nezávislá korelace hladiny FGF23 s hladinou MMP-2, fosfátů a PTH, inverzní korelace FGF23 s hladinou kalcitriolu. Hladina MMP2 nezávisle korelovala s fosfatémií.
- b) Anamnéza KV chorob nejtěsněji korelovala s hladinou FGF23 a s věkem.

#### 4.3.2. PIGF, matrix-metaloproteinázy, EN-RAGE a echokardiografické parametry u osob s CKD 2-4. Prospektivní observační studie.

- a) LVMI nezávisle koreloval s hladinou PIGF, BNP, systolickým TK a eGFR. Diastolická funkce LK nezávisle korelovala s eGFR a hladinou EN-RAGE.
- b) Během sledovaného období jsme spolu se snižující eGFR zaznamenali zvýšení LVMI, rozměru levé síně, EN-RAGE, FGF23 a BNP, naopak bylo zjištěno snížení EFLK, s-albuminu, hladiny vitamínu D a hemoglobinu.
- c) Během sledovaného období jsme zaznamenali zvyšující se LVMI, vyšší výskyt abnormální geometrie LK a diastolické dysfunkce. Tyto trendy však nebyly statisticky signifikantní.

## 5. DISKUSE

### 5.1. Fibroblastový růstový faktor 23, matrix-metaloproteinázy a kardiovaskulární anamnéza osob s CKD 1-5. Průřezová studie.

Nemocní s CKD měli dle našich výsledků vyšší hladiny FGF23, PAPP-A a MMP-2, oproti kontrolám. Tyto parametry inverzně korelovaly s eGFR, což již bylo popsáno (37, 41). Roli zde zřejmě hraje snížená renální clearance a/nebo kompenzatorně zvýšená produkce jako odpověď na minerálovou dysbalanci a mikrozánět. Zvýšení FGF23 je reakcí na retenci fosfátů. Sérový FGF23 koreloval s hladinou PTH, fosfátů, kalcitriolu a s eGFR, ve shodě s literaturou (20, 24). Zvýšený FGF23 byl nejsilnějším prediktorem deficitu kalcitriolu, nezávisle na zásobách vitamínu D, fosfatémií a eGFR. Anamnéza KV chorob podle našich dat nejtěsněji korelovala s hladinou FGF23 a s věkem. Hladiny FGF23, PAPP-A a PTH se zvyšovaly s věkem, zatímco hladina kalcitriolu se s věkem snižovala, což může odrážet souvislost stárnutí s oxidačním stresem, mikrozánětem a CKD-MBD. Hladina MMP-2 korelovala s fosfatémií a s hladinou FGF23, přičemž tato korelace nebyla dosud u CKD popsána. Zvýšená fosfatémie indukuje osteoblastickou diferenciaci VSMCs a produkci cytokinů (18). Hladiny FGF23 v našem souboru rostly dříve než hladiny MMP-2, což může znamenat, že FGF23 je jedním ze stimulů zvýšené produkce MMP-2. Hladina PTH rostla dříve než nastaly změny v hladinách kalcitriolu, FGF23 nebo Ca a Pi. Toto pozorování možná odráží citlivou reakci PTH na deficit kalcitriolu. V jiných pracích byla popsána elevace FGF23 jako nejčasnější laboratorní projev CKD-MBD (20). Nejistili jsme rozdíl mezi hladinami cholesterolu,

CRP, věkem, kouřením nebo BMI mezi jednotlivými stádii CKD, což podporuje význam specifických KV rizikových faktorů u CKD.

FGF23 je zřejmě spojovacím článkem mezi minerálovou dysbalancí, HLK a KV mortalitou. FGF23 je jedním z časných stimulů patogeneze sekundární hyperparathyreózy, KV chorob a progresu CKD (38, 41). Hladiny FGF23 inverzně korelovaly s hladinami kalcitriolu, ale nekorelovaly s fosfaturíí. Naopak hladina PTH korelovala s fosfaturíí i s hladinou kalcitriolu, což naznačuje, že PTH by mohlo být efektivnější než FGF23 v podpoře fosfaturie. Hyperfosfatémie je hlavním rizikovým faktorem mortality u CKD, proto doporučení NKF K/DOQI pro stadium CKD 3-4 navrhuje restrikcí fosfátů a užívání fosfátových vazačů již při fosfatémii >1.49 mmol/l. Redukcí fosfátové zátěže lze dosáhnout snížení hladin FGF23 i PTH, a sice dietní restrikcí fosfátů, fosfátovými vazači, cinacalcetem a nízkými dávkami VDRA (17, 19). Pomocí hladin FGF23 by bylo možné vést dietní restrikcí fosfátů i tehdy, když je fosfatémie ještě v normě. Otázkou je, zda by snížení hladin FGF23 zlepšilo KV prognózu CKD nemocných. U zvířat zmírnily protilátky proti FGF23 sekundární hyperparatyreózu, ale neovlivnily LVMI, zvýšily VC a riziko úmrtí (22).

## **5.2. Placentární růstový faktor , matrix-metaloproteinázy, Extracelulární nově identifikovaný RAGE vazebný protein a echokardiografické parametry osob s CKD 2-4. Prospektivní observační studie.**

U nemocných s CKD 2-4 jsme popsali vysokou prevalenci HLK a remodelace LK. Tyto abnormality byly častější ve vyšších stádiích CKD. Zvýšený LVMI byl nalezen u 14% pacientů s CKD 2, u 21% pacientů s CKD 3 a u 48% pacientů ve stádiu CKD 4, obdobně jako v literatuře (8). Během sledovaného období byl zjištěn zvýšený LVMI u 29% vs. 37.1% nemocných (bazální vs. finální data) (Tabulka 2). Vysoká prevalence HLK u nemocných s CKD byla v literatuře popsána, ale studie jsou obtížně srovnatelné, z důvodů různé definice HLK, rozdílné populace a kontroly TK, včetně léčby ACEI a ARB (10, 11). Abnormální LV geometrii jsme zjistili u 43.5% vs. 56.5% abnormální diastolickou funkci LK u 74.1% vs. 75.8% nemocných (bazální vs. finální data). Ve studii CREATE byl u CKD 3-4 popsán výskyt HLK u 47% nemocných, během 2 let se LVMI významně nezměnil (CREATE). LVMI dle literatury koreluje s věkem, TK, BNP, CRP, troponinem T, proteinurií, albuminemií, zánětlivými markery, FGF23, CaxP součinem a negativně s GFR, hladinou hemoglobinu a 25(OH)D (10, 11). LVMI v našem souboru nezávisle koreloval s PIGF, BNP, s-kreatininem a systolickým TK. Korelace hladin PIGF s hmotností LK byla dosud popsána jen ve zvířecím modelu CKD. Myši nadměrně exprimující PIGF, měly více kardiální hypertrofie, vyšší hustotu kapilár a obsah fibroblastů v srdci, v odpovědi na stres. Naopak, PIGF(-/-) myši uhynuly na srdeční selhání do 1 týdne od počátku tlakové zátěže. PIGF zřejmě pomocí parakrinních faktorů stimuluje myocyty, angiogenezi v ischemické zóně, ztlustění intimy a

akumulaci makrofágů. V AS lézích je exprese PIGF spojena se zánětem a destabilizací plátu. Podání anti-PIGF protilátek zpomaluje destabilizaci plátu. Exprese PIGF v endotelu a VSMCs je indukována angiotensinem II a aldosteronem a naopak mineralokortikoidní antagonisté inhibují expresi PIGF. Hladiny PIGF jsou vyšší u CKD nemocných oproti kontrolám a vyšší u nemocných s KV anamnézou, oproti nemocným bez KV anamnézy (37), což se shoduje s naším pozorováním.

Hypertrofie LK je prediktorem KV příhod a rizika progresu do ESRD (10). Několik studií u CKD však neprokázalo korelaci mezi TK a LVM, což naznačuje, že klíčovou roli ve vývoji HLK mohou hrát jiné profibrogenní faktory (16). FGF23 v experimentu způsobilo hypertrofii kardiomyocytů a podávání blokátoru FGF-receptoru HLK zmírnilo. Podle našich dat však hladiny FGF23 korelovaly s LVMI pouze v univariální analýze. Naopak korelace hladin PTH s EFLK byla významná i v multivariální analýze. V experimentu byla popsána asociace hladin PTH s myokardiální hypertrofií, fibrózou a vyšším skóre koronárních lézí (19). Diastolická dysfunkce LK byla popsána již v časných stádiích CKD 1-2 (9). Závažnost CKD je nejvýznamnějším prediktorem zvýšeného plnicího tlaku LK (20, 24). Naše vstupní data v souboru nemocných s CKD 2-4 ukazují normální diastolickou funkci u 25,8% nemocných, poruchu relaxace u 43,5% a pseudonormální charakter plnění LK u 30,6% nemocných (Tabulka 2). U nemocných s CKD 4-5 byla diastolická dysfunkce popsána u 85% nemocných a byla prediktorem mortality (6). Naše data ukázala korelaci hladiny EN-RAGE s rozměrem levé síně a inverzní korelaci EN-RAGE s poměrem E/A, což dosud nebylo publikováno. Podle literatury přispívá EN-RAGE k zánětu a ateroskleróze a časná blokáda RAGE pomocí statinů předchází zánětu v ateroskleróze. Hladiny EN-RAGE u CKD korelují s CRP a inverzně s sRAGE. Mezi sRAGE a LVMI byla popsána inverzní korelace (35), v naší studii jsme ji však nepotvrdili.

Během sledovaného období jsme spolu se snižující se eGFR zjistili zvýšení LVMI, rozměru levé síně, EN-RAGE, FGF23, BNP, snížení EFLK, albuminémie, hladiny vitamínu D a hemoglobinu, což je v souladu s literaturou (3, 4, 8). Popsali jsme rostoucí procento pacientů se zvýšeným LVMI, abnormální geometrií LK, sníženou EFLK a diastolickou dysfunkcí LK (Tab 2), tyto trendy však nebyly signifikantní, možná díky limitované době sledování.

## 6. ZÁVĚRY

Naše data dokumentují nezávislou asociaci hladin FGF23 a MMP-2 u CKD, což naznačuje možné spojení mezi dysbalancí Ca-P metabolismu, mikrozánětem a KV onemocněním, a to již od stadia CKD 3. Nemocní se zvýšeným FGF23 a MMP-2 mají vysoké riziko KV komplikací a progresu CKD. Těmto nemocným by měla být poskytnuta komplexní preventivní péče již od časných stádií CKD, s důrazem na specifické KV rizikové faktory (Ca-P dysbalance a mikrozánět). Výzkum by se měl zaměřit na možnou kauzalitu vztahu FGF23 a MMP-2, na snížení zátěže fosfáty, antagonizování FGF23 a klinické výstupy těchto postupů u CKD.

Dále naše data dokumentují významnou a nezávislou korelaci hladin PIGF se zvýšenou hmotností LK u nemocných s mírnou až středně pokročilou CKD. Hladiny EN-RAGE u této populace silněji korelují s diastolickou dysfunkcí LK. Prezentujeme sériové echokardiografické změny u nemocných s CKD 2–4, jako je zvýšení LVMI a progresu diastolické dysfunkce provázející zhoršování renální funkce. Další výzkum je nezbytný k ozřejmění takové strategie, která by dokázala zachovat kardiální strukturu a funkci. Mezi tradičními a netradičními (MBD) rizikovými faktory je nyní třeba nalézt ty, které mohou být modifikovány a na které může cílit léčba.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Stenvinkel P, Larsson TE. Chronic kidney disease: a clinical model of premature aging. *Am J Kidney Dis.* 2013 Aug;62(2):339-51
2. Ritz E<sup>1</sup>, Bommer J. Cardiovascular problems on hemodialysis: current deficits and potential improvement. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009 Dec;4 Suppl 1:S71-8.
3. Ix JH, de Boer IH, Peralta CA, et al. Serum phosphorus concentrations and arterial stiffness among individuals with normal kidney function to moderate kidney disease in MESA. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2009;4(3):609–615
4. London GM. Bone-vascular cross-talk. *J Nephrol.* 2012 Sep-Oct;25(5):619-25.
5. Vervloet MG<sup>1</sup>, Massy ZA<sup>2</sup>, Ureña-Torres P<sup>6</sup>, Bover J<sup>7</sup>, Goldsmith D<sup>8</sup>; CKD-MBD Working Group of ERA-EDTA. Bone: a new endocrine organ at the heart of chronic kidney disease and mineral and bone disorders. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014 May;2(5):427-36.
6. Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH: Diastolic heart failure-Abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N Engl J Med* 350: 1953–1959, 2004
7. London GM. Left ventricular hypertrophy: why does it happen? *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Nov;18 Suppl 8
8. Smith K, deFilippi C, Isakova T, Gutiérrez OM, Laliberte K, Seliger S, Kelley W, Duh SH, Hise M, Christenson R, Wolf M, Januzzi J. Fibroblast growth factor 23, high-sensitivity cardiac troponin, and left ventricular hypertrophy in CKD. *Am J Kidney Dis.* 2013 Jan;61(1):67-73.
9. Ritz E, Wanner C: : The challenge of sudden death in dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: 920–929, 2008
10. Paoletti E, Bellino D, Cassottana P, Cannella G. Is left ventricular hypertrophy a powerful predictor of progression to dialysis in chronic kidney disease? *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Feb;26(2):670-7.
11. Paoletti E, Zoccali C. A look at the upper heart chamber: the left atrium in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2013 Nov 27.
12. Weber K: Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med* 348: 1689, 2001
13. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J: The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341: 709–717, 1999
14. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M: Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 348: 1309–1321, 2003
15. Stenvinkel P, Ikizler TA, Mallamaci F, Zoccali C. Obesity and nephrology: results of a knowledge and practice pattern survey. *Nephrol Dial Transplant.* 2013 Nov;28 Suppl 4:iv99-104.
16. Massy ZA.: The role of lipids and uremic toxins in cardiovascular disease in CKD. *Clin Exp Nephrol.* 2014 Apr;18(2):255-6.
17. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl.* 2009 Aug;(113):S1-130
18. Kestenbaum B, Sampson JN, Seliger SL, Young B, Sherrard DJ, Andress DL.: Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Feb;16(2):520-8.
19. Moe SM, Drüeke TB, Block GA, et al. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) *Kidney International.* 2009;113:S1–S130.
20. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney International.* 2011;79(12):1370–1378.
21. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *The New England Journal of Medicine.* 2008;359(6):584–592.
22. Shalhoub V, Shatzken EM, Ward SC, et al. FGF23 neutralization improves chronic kidney disease-associated hyperparathyroidism yet increases mortality. *Journal of Clinical Investigation.* 2012;122(7):2543–2553
23. Mendoza JM, Isakova T, Ricardo AC, Xie H, Nessel L, Leonard MB, Raj D, Wolf M, for the Chronic Renal Insufficiency Cohort: Fibroblast growth factor 23 and inflammation in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 7: 1155–1162, 2012



24. Isakova T, Gutiérrez OM, Smith K, et al. Pilot study of dietary phosphorus restriction and phosphorus binders to target fibroblast growth factor 23 in patients with chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011;26(2):584–591
25. Drüeke TB. Role of vitamin D in vascular calcification: bad guy or good guy? *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2012;27(5):1704–1707.
26. Levin A, Li YC.: Vitamin D and its analogues: do they protect against cardiovascular disease in patients with kidney disease? *Kidney Int*. 2005 Nov;68(5):1973-81
27. Ritz E, Gross ML, Dikow R. Role of calcium-phosphorous disorders in the progression of renal failure. *Kidney Int Suppl*. 2005 Dec;(99):S66-70. Review.
28. EVOLVE Trial Investigators, Chertow GM, Block GA, Correa-Rotter R, Drüeke TB, Floege J, Goodman WG, Herzog CA, Wheeler DC, Parfrey PS. Effect of cinacalcet on cardiovascular disease in patients undergoing dialysis. *N Engl J Med*. 2012 Dec 27;367(26):2482-94.
29. Moe SM<sup>1</sup>, Thadhani R. What have we learned about chronic kidney disease-mineral bone disorder from the EVOLVE and PRIMO trials? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013 Nov;22(6):651-5.
30. Cannata-Andía JB, Fernández-Martín JL, Locatelli F, London G, Ketteler M, Covic A, Zoccali C. Use of phosphate-binding agents is associated with a lower risk of mortality. *Kidney Int*. 2013 Nov;84(5):998-1008
31. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Jul;18(7):1272-80. Review.
32. Schindler R. Causes and therapy of microinflammation in renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Aug;19 Suppl 5:V34-40. Review.
33. Mezzano D, Pais EO, Aranda E, González F, Pereira J. Inflammation, not hyperhomocysteinemia, is related to oxidative stress and hemostatic and endothelial dysfunction in uremia. *Kidney Int*. 2001 Nov;60(5):1844-50.
34. Miyata T, Sugiyama S, Saito A, Kurokawa K. Reactive carbonyl compounds related uremic toxicity ("carbonyl stress"). *Kidney Int Suppl*. 2001 Feb;78:S25-31.
35. Isoyama N, Leurs P, Qureshi AR, Bruchfeld A, Bárány P, Stenvinkel P, Lindholm B. Plasma S100A12 and soluble receptor of advanced glycation end-products levels and mortality in chronic kidney disease Stage 5 patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Jul 28.
36. Aveles PR, Criminácio CR, Gonçalves S, Nakao LS, Pecoits-Filho R. Association between biomarkers of carbonyl stress with increased systemic inflammatory response in different stages of chronic kidney disease and after renal transplantation. *Nephron Clin Pract*. 2010;116(4):c294-9
37. Accornero F, van Berlo JH, Carmeliet P, Molkentin JD. Placental growth factor regulates cardiac adaptation and hypertrophy through a paracrine mechanism. *Circ Res*. 2011 Jul 22;109(3):272-80
38. Lenz O, Elliot SJ, Stetler-Stevenson WG: Matrix metalloproteinases in renal development and disease. *J Am Soc Nephrol* 2000, 11(3):574-581.
39. McCullough PA, et al. B-type natriuretic peptide and renal function in the diagnosis of heart failure: an analysis from the Breathing Not Properly Multinational Study. *Am J Kidney Dis* 2003;41:571-579.
40. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Stewart WJ, Chamber Quantification Writing Group, American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee, European Association of Echocardiography: Recommendations for chamber quantification, developed in conjunction with the European association of echocardiography, a branch of the European society of cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005, 18(12):1440–1463.
41. Faul C.: Fibroblast growth factor 23 and the heart. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012 Jul;21(4):369-75
42. Nakashima A, Carrero JJ, Stenvinkel P, Lindholm B: Effect of circulating soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and the proinflammatory RAGE ligand (EN-RAGE, S100A12) on mortality in haemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010, 5(12):2213-2219

## 8. SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA

### 8.1. PUBLIKACE, KTERÉ JSOU PODKLADEM DISERTACE

Peiskerová M, Kalousová M, Danzig V, Miková B, Hodková M, Němeček E, Bani-Hani A, Ambrož D, Benáková H, Linhart A, Zima T, Tesař V: Placental growth factor may predict increased left ventricular mass index in patients with mild to moderate chronic kidney disease--a prospective observational study. *BMC Nephrol.* 2013 Jul 11;14:142 (IF 1.64)

Peiskerová M, Kalousová M, Kratochvílová M, Uhrová J, Sulková S, Zima T, Tesař V: Fibroblast growth factor 23 and matrix-metalloproteinases in patients with chronic kidney disease. Are they associated with cardiovascular disease? *Kidney and Blood Pressure Research* 2009;32(4):276-83. (IF 1, 596)

### 8. 2. PUBLIKACE BEZ VZTAHU K TÉMATU DISERTACE

#### a) s impact factorem

Baigent C, Landray MJ, Reith C, SHARP investigators ( incl. Peiskerova M.) The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2011, Jun 25;377(9784):2181-92. (IF 33,6)

Haluzik M, Sulková S, Svobodová J, Bednárová V, Bodlákova B, Marková M, Turková-Peiskerová M, Jiskra J, Haas T.: Serum leptin levels in diabetic patients on hemodialysis: the relationship to parameters of diabetes metabolic control. *Endocr Res.* 2000 May ;26(2):303-17. (IF 0.77)

#### b) bez IF

Slavíčková R., Monhart V, Žabka J, Suchanová J, Ryba M., Peiskerová, M. et al.: Anémie a metabolismus železa u nemocných dispenzarizovaných pro chronické onemocnění ledvin stadia 2-5, *Aktuality v nefrologii*, 2/2009, roč. 15, č. 2, s. 53-62. ISSN: 1210-955X; 1213-3248 Tigris, Praha

Svačina S. a kolektiv (incl. Peiskerová M).: *Klinická dietologie*, Grada 2008 (spoluautorka kapitoly *Výživa v nefrologii*), s. 231-257