

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Biomedicína

Biochemie a patobiochemie

MUDr. Martina Peiskerová



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

Fibroblastový růstový faktor 23, matrix-metaloproteinázy, placentární růstový faktor, hypertrofie levé komory srdeční a diastolická dysfunkce 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, left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in patients with chronic kidney disease.

Disertační práce

Vedoucí disertační práce/Školitel:

Prof. MUDr. Marta Kalousová, PhD.

Konzultant:

Doc. MUDr. Vilém Danzig, PhD.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala 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 Praze, 17. 3. 2015

MUDr. Martina Peiskerová

Podpis

Identifikační záznam:

Peiskerová, Martina. Oxidační a karbonylový stres, mikrozánět a kardiovaskulární riziko u pacientů s onemocněním ledvin [Oxidative and carbonyl stress, microinflammation and cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease]. Praha, 2015. Počet stran 115, počet příloh 2. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK. Školitel Prof. MUDr. Marta Kalousová, PhD.

Klíčová slova:

Biomarkery kardiovaskulárního rizika, diastolická funkce levé komory, echokardiografie, extracelulární nově identifikovaný RAGE-vazebný ligand (EN-RAGE/S100A12), fibroblastový růstový faktor 23 (FGF23), hmotnostní index levé komory (LVMI), hypertrofie levé komory (HLK), chronické onemocnění ledvin (CKD), placentární růstový faktor (PIGF), kardiovaskulární onemocnění, matrix-metaloproteinázy

Keywords:

Biomarkers of cardiovascular risk, cardiovascular disease, chronic kidney disease (CKD), echocardiography, extracellular newly identified RAGE-ligand (EN-RAGE/S100A12), fibroblast growth factor 23 (FGF23), left ventricular diastolic function, left ventricular hypertrophy (LVH), left ventricular mass index (LVMI), placental growth factor (PIGF), matrix-metalloproteinases

Poděkování:

Na prvním místě děkuji své školitelce Prof. MUDr. Martě Kalousové, PhD. za vynikající odborné vedení. Za neocenitelnou pomoc dále děkuji přednostovi Kliniky nefrologie Prof. MUDr. Vladimíru Tesařovi, DrSc. a svému konzultantovi Doc. MUDr. Vilému Danzigovi, PhD. V neposlední řadě patří díky mé rodině za trpělivost a veškerou podporu mé práci.

Dále děkuji za technickou pomoc MUDr. Janě Uhrové a paní Ditě Hudcové z Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. Za pomoc se statistickou analýzou děkuji RNDr. Věře Lánské a MUDr. Štěpánu Bandúrovi z IKEM. Práce byla podpořena výzkumnými záměry: RVO-VFN64165/2012 Ministerstva zdravotnictví, výzkumným záměrem Karlovy Univerzity P25/LF1/2, výzkumným záměrem Ministerstva školství ČR, MSM 0021620807 a SVV projekty: SVV 260 031 (2014), SVV 266 515 (2013), SVV 264 511 (2012) a SVV 262 512 (2011).

<u>Seznam obrázků:</u>	<u>Strana</u>
Obrázek 1: Rizikové faktory KV chorob u ESRD nemocných	...14
Obrázek 2: Kardiorenální syndromy	...15
Obrázek 3: Úloha fosfátů v patogenezi cévních kalcifikací	...18
Obrázek 4: Souvislosti mezi minerálovou dysbalancí, FGF23 a KV komplikacemi	...33
Obrázek 5: Kardiorenální syndrom typu IV	...54

Seznam tabulek:

Tabulka 1: Příčiny smrti u incidentních & prevalentních dialyzovaných pacientů 2009–2011	...16
Tabulka 2: Biologické účinky AGEs/ALEs a RCOs	...45
Tabulka 3: Doporučené cílové hodnoty parametrů u CKD 3-4 [KDIGO]	...89
Tabulka 4: FGF23 u různých stádií CKD. Klinické, demografické a laboratorní charakteristiky studijní skupiny a kontrol	...69
Tabulka 5: FGF23 u různých stádií CKD. Korelace laboratorních markerů v univariální analýze	...71
Tabulka 6: Faktory asociované s FGF23. Multivariální regresní analýza (FGF23 jako závislá proměnná), adjustace na věk, MDRD, sérový fosfát	...72
Tabulka 7: Faktory asociované s MMP-2. Multivariální regresní analýza (hladina MMP2 jako závislá proměnná), adjustace na věk, MDRD	...72
Tabulka 8: PIGF a echokardiografické parametry u CKD. Vstupní klinické a demografické charakteristiky sledovaného souboru	...76
Tabulka 9: Echokardiografické charakteristiky (%) sledovaného souboru (n = 62)	...77
Tabulka 10 : Nezávislé korelace laboratorních a echokardiografických parametrů (stepwise multiple regression)	...78
Tabulka 11: Změny laboratorních a echokardiografických parametrů během sledovaného období	...79

Seznam grafů:

Graf 1. FGF23 u kontrolních a CKD nemocných s a bez anamnézy KV chorob	...72
Graf 2. Korelace hladin MMP-2 a FGF23 ($r= 0,42, p< 0,0001$)	...73
Graf 3. Korelace hladin kalcitriolu a FGF23 ($r= -0,59, p< 0,0001$)	...73
Graf 4. Korelace sérových fosfátů a MMP-2 ($r= 0,3, p< 0,004$)	...74
Graf 5. Sérové FGF23 v různých stádiích CKD a u zdravých kontrol	...74
Graf 6. Sérové MMP-2 v různých stádiích CKD a u zdravých kontrol	...75
Graf 7: Korelace hladin PIGF a hmotnostního indexu LK ($\text{g/m}^{2,7}$), $r = 0,31, p < 0,02$...81
Graf 8: Index hmotnosti LK ($\text{g/m}^{2,7}$) v různých stádiích CKD.	...81

Seznam zkratk:

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

LVH, hypertrofiie levé komory;
 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- κ 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- α -konvertující enzym;
 TAG, triacylglyceroly;
 TGF β 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;

<u>OBSAH</u>	<u>Strana</u>
1. ÚVOD	...13
1.1. Chronické onemocnění ledvin (CKD)	...13
1.2. Kardiorenální syndromy	...13
1.3. Ateroskleróza, ztuhnutí stěny tepen, cévní kalcifikace	...16
1.4. Hypertrofie levé komory	...19
1.5. Diastolická dysfunkce	...20
1.6. Tradiční faktory kardiovaskulárního rizika u nemocných s CKD	...21
1.6.1. Hypertenze, systém renin angiotensin aldosteron, sůl	...21
1.6.2. Albuminurie	...23
1.6.3. Obezita	...24
1.6.4. DM 2. typu, inzulinová rezistence	...24
1.6.5. Dyslipidémie	...25
1.7. Netradiční faktory kardiovaskulárního rizika u nemocných s CKD	...26
1.7.1. Uremické toxiny, glomerulární filtrace	...26
1.7.2. Minerálová a kostní nemoc při chronickém onemocnění ledvin (CKD-MBD), fibroblastový růstový faktor 23, Klotho, fosfatémie, parathormon, aktivní vitamin D	...27
1.7.3. Oxidační a karboxylový stres. Mikrozáněť	...36
1.7.4. Malnutrice – záněť – ateroskleróza (malnutrition-inflammation-atherosclerosis; protein energy wasting)	...45
1.7.5. Placentární růstový faktor (PIGF)	...46
1.7.6. Matrix-metaloproteinázy, Protein A spojený s těhotenstvím (PAPP-A)	...48
1.7.7. Natriuretické peptidy, srdeční troponiny	...51
1.7.8. Anémie	...52
1.7.9. Vitamin K	...53
1.7.10. Opomíjená KV rizika	...53
1.8. Biomarkery kardiovaskulárního rizika u CKD – shrnutí	...54
2. CÍLE STUDIE	...54
3. MATERIÁL A METODY	...55
3.1. SUBJEKTY	...55
3.1.1. Fibroblastový růstový faktor 23, matrix-metaloproteinázy a kardiovaskulární anamnéza u nemocných s CKD 1-5. Průřezová studie	...55
3.1.2. Placentární růstový faktor, matrix-metaloproteinázy, nově identifikovaný extracelulární	

RAGE-vazebný protein (EN-RAGE) a echokardiografické parametry u CKD 2-4	
Prospektivní observační studie	...56
3.2. Biochemická analýza	...57
3.2.1. Stanovení placentárního růstového faktoru (PIGF) v séru metodou ELISA	...57
3.2.2. Stanovení PAPP-A v séru metodou TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission immunofluorescent assay)	...58
3.2.3. Stanovení MMP-2 v séru metodou ELISA	...59
3.2.4. Stanovení MMP-9 v séru metodou ELISA	...60
3.2.5. Stanovení S100A12/EN-RAGE v séru metodou ELISA	...61
3.2.6. Stanovení FGF23 (C-terminálního fragmentu) v séru metodou ELISA	...62
3.2.7. Stanovení kalcitriolu v séru metodou RIA	...63
3.2.8. Měření dalších parametrů	...65
3.3. Echokardiografie	...66
3.4. STATISTICKÁ ANALÝZA	...67
3.4.1. Fibroblastový růstový faktor 23, matrix-metaloproteinázy a kardiovaskulární anamnéza u nemocných s CKD 1-5. Průřezová studie	...67
3.4.2. Placentární růstový faktor , matrix-metaloproteinázy, nově identifikovaný extracelulární RAGE-vazebný protein (EN-RAGE) a echokardiografické parametry u nemocných s CKD 2-4. Prospektivní observační studie	...67
4. VÝSLEDKY	...68
4.1. Fibroblastový růstový faktor 23, matrix-metaloproteinázy a kardiovaskulární anamnéza u nemocných s CKD 1-5. Průřezová studie	...68
4.1.1. Vliv renální funkce na hladiny fibroblastového růstového faktoru 23 a matrix-metaloproteináz	...68
4.1.2. Vztah koncentrací FGF23 a matrix-metaloproteináz ke komorbiditám, k věku, pohlaví, typu renálního onemocnění a substituci vitamínem D	...70
4.1.3. Korelace mezi jednotlivými laboratorními markery	...70
4.1.4. Shrnutí výsledků	...71
4.2. Placentární růstový faktor , matrix-metaloproteinázy, nově identifikovaný extracelulární RAGE-vazebný protein (EN-RAGE) a echokardiografické parametry u osob s CKD 2-4. Prospektivní observační studie	...75
4.2.1. Vstupní echokardiografické parametry studovaného souboru	...75
4.2.2. Echokardiografické parametry studovaného souboru na konci sledování	...76

4.2.3. Vliv renální funkce na laboratorní a echokardiografické parametry a jejich změny během sledovaného období	...78
4.2.4. Laboratorní parametry pacientů s anamnézou kardiovaskulárního onemocnění	...80
4.2.5. Shrnutí výsledků	...80
5. DISKUSE	...82
5.1 Fibroblastový růstový faktor 23, matrix-metaloproteinázy a kardiovaskulární anamnéza osob s CKD 1-5. Průřezová studie	...82
5.2. Placentární růstový faktor , matrix-metaloproteinázy, EN-RAGE a echokardiografické parametry osob s CKD 2-4. Prospektivní observační studie	...84
5.3. Jak snížit kardiovaskulární mortalitu u CKD	...87
6. ZÁVĚRY	...92
6.1. Fibroblastový růstový faktor 23, matrix-metaloproteinázy a kardiovaskulární anamnéza osob s CKD 1-5. Průřezová studie	...92
6.2. Placentární růstový faktor , matrix-metaloproteinázy, EN-RAGE a echokardiografické parametry osob s CKD 2-4. Prospektivní observační studie	...93
7. LITERATURA	...94
8. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA	...115
8.1. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ BYLY PODKLADEM DISERTAČNÍ PRÁCE	...115
8.2. SEZNAM OSTATNÍCH PUBLIKACÍ	...115
9. PŘÍLOHY: PUBLIKACE DOKTORANDA, KTERÉ BYLY PODKLADEM DISERTAČNÍ PRÁCE	

Peiskerová M, Kalousová M, Danzig V, Míková 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.

Peiskerová M, Kalousová M, Kratochvílová M, Dusilová-Sulková S, Uhrová J, Bandúr S, Malbohan IM, Zima T, Tesař V. Fibroblast growth factor 23 and matrix-metalloproteinases in patients with chronic kidney disease: are they associated with cardiovascular disease? *Kidney Blood Press Res.* 2009;32(4):276-83.

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 biomarkery spojené s KV rizikem patří i 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, byl sledován vývoj echokardiografických parametrů u 62 subjektů s CKD 2-4, po průměrnou dobu 36 ± 10 měsíců. Hladiny FGF23, MMP-2, MMP-9 a PIGF byly měřeny metodou ELISA. K detekci nezávislých korelací byla použita multivariantní regresní analýza.

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 byly počáteční vs. konečné parametry 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, cholesterolem, BNP, krevním tlakem a sérovým kreatininem. EN-RAGE s rozměrem levé síně a inverzně s poměrem E/A, jenž je korelátem diastolické funkce.

Závěry: Naše data svědčí pro asociaci markerů metabolické a kostní choroby se zánětem a KV rizikem u nemocných s CKD. Další výzkum by měl ukázat, 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. FGF23, MMPs and PIGF belong among these non-traditional biomarkers of CV risk. FGF23 is a phosphaturic hormone and inhibitor of calcitriol synthesis. It is associated with vascular calcifications. Matrix-metalloproteinases (e.g. MMP-2, MMP-9) are proteolytic, proinflammatory enzymes, contributing to myocardial remodeling. Placental growth factor (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 evaluated echocardiographic and laboratory parameters in 62 patients with CKD 2-4 for an average study period of 36±10 months. FGF23, MMP-2, MMP-9 and PIGF serum levels were assessed by ELISA method. Multivariate regression analysis was used to detect independent correlations.

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, 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 show an association of metabolic and bone disease with inflammation and CV risk 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.

1. ÚVOD

Pacienti s chronickým onemocněním ledvin (chronic kidney disease, CKD stadia 1-5), mají 10-20x vyšší riziko kardiovaskulárních (KV) chorob oproti běžné populaci. Toto riziko je způsobeno kumulací tradičních a netradičních (CKD specifických) rizikových faktorů. Prevalence CKD stoupá a patofyziologické souvislosti onemocnění srdce a ledvin jsou intenzivně studovány. Nejdůležitějšími mechanismy, zodpovědnými za vysokou KV morbiditu a mortalitu nemocných s CKD, jsou: hypertenze, hyperreaktivita systému renin-angiotensin-aldosteron (RAAS), anémie, retence vody a sodíku, endoteliální dysfunkce, dysbalance minerálů a vitamínu D, mikrozánět a oxidační stres (3). Zároveň probíhá intenzivní výzkum biomarkerů, které by mohly propojovat CKD a KV onemocnění. Mezi tyto biomarkery patří také 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 CKD nemocných jsou: cévní kalcifikace, akcelerovaná ateroskleróza, hypertrofie levé komory (HLK), myokardiální fibróza a náhlá smrt (8).

1.1. Chronické onemocnění ledvin (CKD)

Chronickým onemocněním ledvin (CKD) rozumíme abnormální strukturu nebo funkci ledvin, přítomnou alespoň po dobu 3 měsíců, mající zdravotní důsledky. CKD znamená přítomnost renálního poškození, mezi jehož projevy patří albuminurie, abnormality močového sedimentu, sérových elektrolytů, urey a kreatininu, abnormality detekované histologicky, zobrazovacími metodami, snížení glomerulární filtrace (GFR) $< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ a / nebo anamnéza transplantace ledviny. Mezinárodní klasifikace CKD vychází z NKF-DOQI klasifikace a používá se od roku 2002. CKD je rozdělena do 5 stádií (CKD 1 – 5), dle úrovně reziduální GFR. Stádium CKD 5D již znamená nutnost náhrady funkce ledvin dialýzou. V roce 2013 byla zveřejněna nová klasifikace CKD [KDIGO], která je založena na úrovni GFR a albuminurie (306).

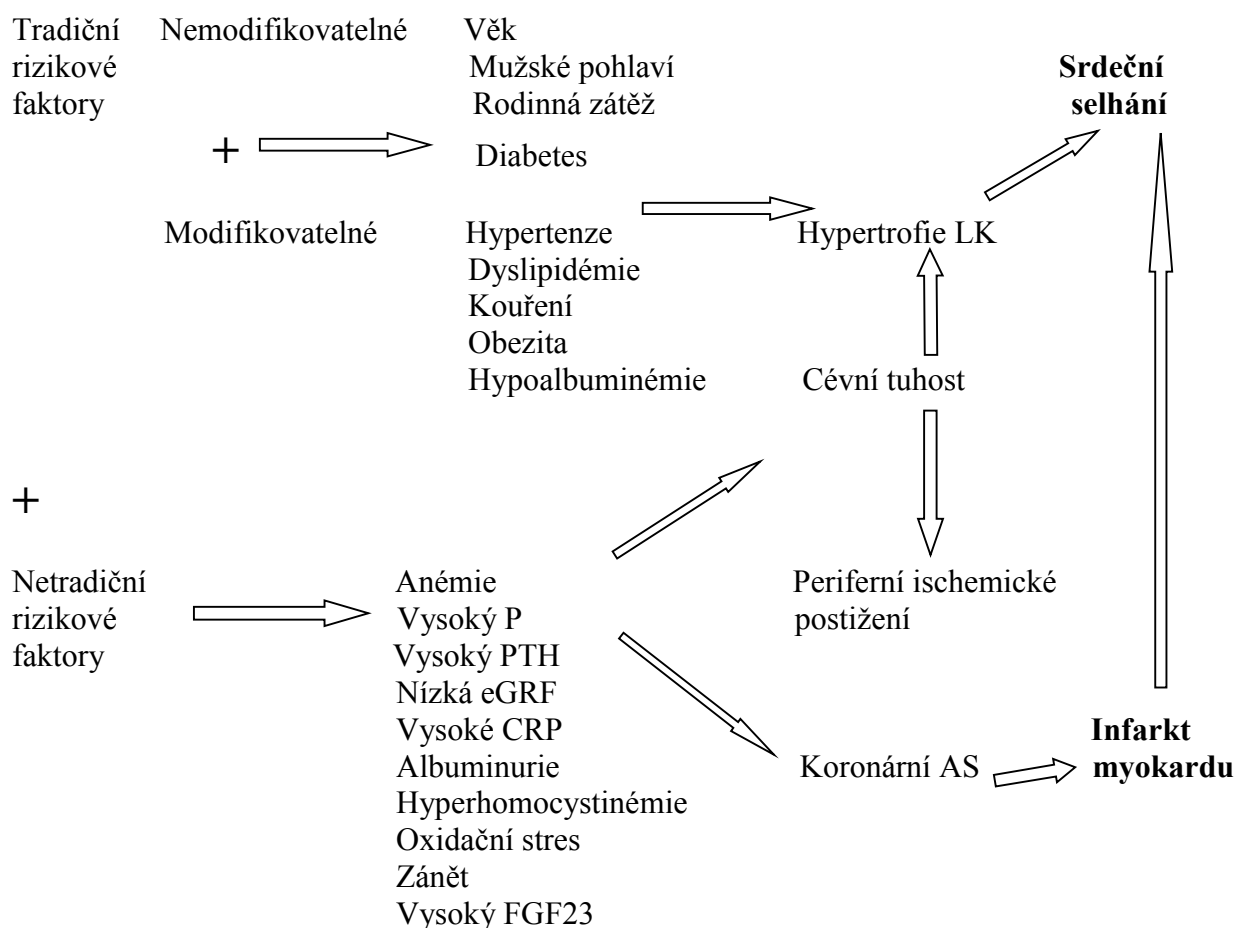
1.2. Kardiorenální syndromy

Chronické onemocnění ledvin je modelem předčasného stárnutí. Stárnutí je spojeno s progresivní akumulací škodlivých změn, s poruchou fyziologické funkce a s vysokým rizikem onemocnění i úmrtí. Stárnutí může být urychleno nevhodným životním stylem a podmínkami životního prostředí, kterým jsou geny vystaveny. CKD podporuje buněčné stárnutí cestou toxické alterace vnitřního prostředí (2). Mnoho pacientů s onemocněním ledvin zemře na KV chorobu před dosažením CKD 5 stádia (3). Etiologie KV onemocnění u CKD je multifaktoriální a je spojena s

mnoha modifikovatelnými, nemodifikovatelnými i specifickými CKD rizikovými faktory (Obrázek 1). Tyto faktory především způsobují zvýšení arteriální tuhosti a krevního tlaku, zvyšují napětí LK a rychlost pulsové vlny (PWV). Bohužel, nemocní s KV chorobami trpící zároveň CKD byli vyloučeni z většiny klinických studií, které jsou podkladem moderní kardiologické péče. Proto jsou dosud doporučení pro léčbu KV chorob u CKD dosud převážně “opinion based” (1).

Podle genetických studií je za asociaci CKD a KV chorob spíše zodpovědný klinický stav a zevní prostředí než genetické faktory. Srdeční arytmie a náhlá smrt jsou nejčastější příčinou úmrtí nemocných s CKD (6). Mezi hlavní příčiny patří: abnormality v koronární mikrocirkulaci, porucha koronární rezervy, redukce aortální poddajnosti, zvýšená aktivita sympatiku, zvýšená koncentrace angiotensinu II, náhlé změny v hladině draslíku, vápníku a hořčíku a srdeční fibróza (7).

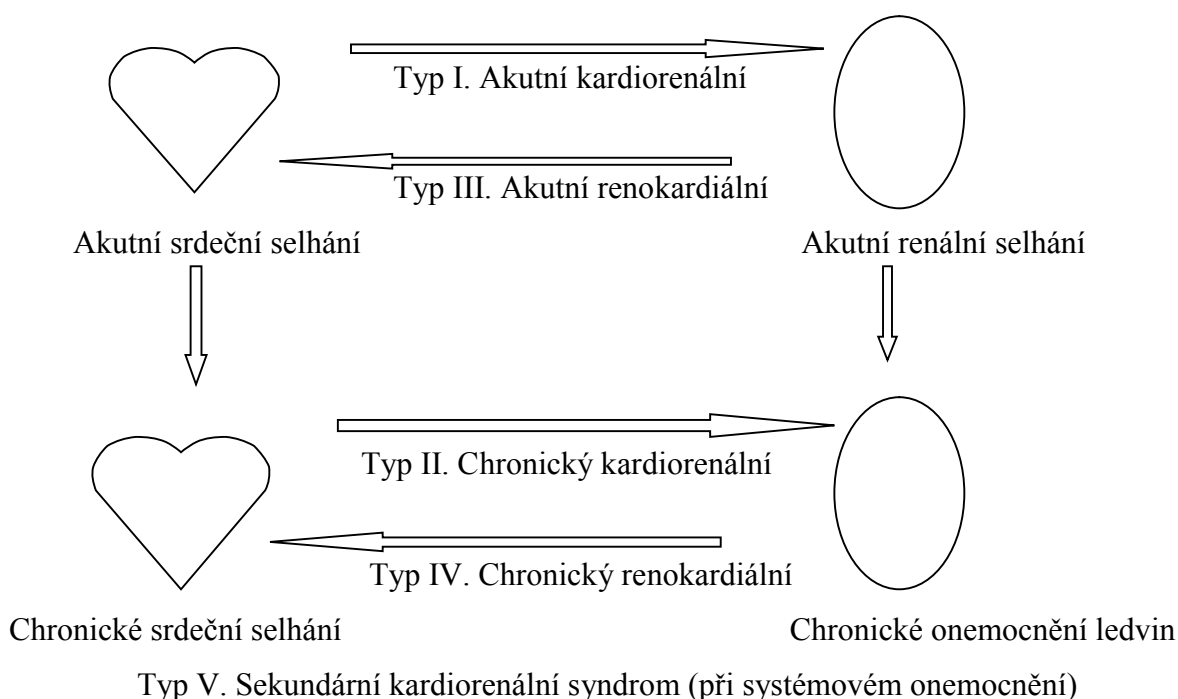
Obrázek 1: Rizikové faktory KV chorob u ESRD nemocných.



Termínem kardiorenální syndromy (KRS) označujeme kombinovanou dysfunkci srdce a ledvin (Obrázek 2). KV systém a ledviny jsou úzce provázané, takže primární změny v jednom systému naruší druhý systém (9). Interakce mezi srdcem a ledvinami jsou fyzikální, chemické i biologické povahy. Organizace ADQI v roce 2008 navrhla následující klasifikaci: KRS I. = akutní zhoršení srdeční funkce vyvolá zhoršení funkce ledvin, KRS II. = chronické abnormality srdeční funkce vedou ke zhoršení funkce ledvin, KRS III. = akutní zhoršení funkce ledvin vede ke zhoršení funkce srdce, KRS IV. = chronické onemocnění ledvin vede k onemocnění srdce a KRS V. = systémové postižení vedoucí k současnému poškození funkce ledvin a srdce (10).

Obrázek 2:

Kardiorenální syndromy



V současnosti jsou jako biomarkery k časně detekci KRS IV. využívány: troponiny, BNP, CRP, sérový amyloid A, ischemií modifikovaný albumin, AGEs, aktivátor plazminogenu typu I, homocystein. Byla popsána korelace zmíněných markerů s KV prognózou. (11, 12). I přes zlepšení v poslední dekádě je přežití dialyzovaných pacientů stále neuspokojivé. Asi 40% úmrtí je z KV příčin. V minulosti bylo KV úmrtí považováno za důsledek koronárního postižení aterosklerózou. Dnes se více zdůrazňuje úloha kardiomyopatie a náhlé srdeční zástavy (3), jako důsledku kardiální fibrózy a poškození mikrocirkulace. Náhlá smrt je nejčastější příčinou úmrtí hemodialyzovaných (HD) nemocných (3) (Tabulka 1).

Tabulka 1: Příčiny smrti u incidentních & prevalentních dialyzovaných pacientů 2009–2011 (435):

	incidentní pacienti	prevalentní pacienti
Celková mortalita (na 1000 osob/rok)	298	194
Procento kardiovaskulární mortality :		
Akutní infarkt myokardu	3,6%	4,7%
Srdeční selhání	5,7%	4,8%
Arytmie/ náhlá srdeční smrt	24,3%	26,9%
Cévní mozková příhoda	2,2%	3,1%
Jiná kardiální příčina	1,5%	1,9%
Kardiovaskulární mortalita celkově	37,3%	41,4%,

1.3. Ateroskleróza, ztuhnutí stěny tepen, cévní kalcifikace

Kalcifikace cévní intimy a média vedou k okluzi a / nebo ke ztluštění stěny tepen. Prevalence cévních kalcifikací (VC) u CKD stoupá s poklesem renální funkce. Výzkumy ukazují, že stupeň VC u CKD nemocných koreluje s výskytem ztuhnutí tepenné stěny, arteriální hypertenzí, HLK a kardiomyopatií a je nezávislým prediktorem celkové i KV mortality, proto se u CKD doporučuje cévní kalcifikace aktivně vyhledávat. Kalcifikace intimy jsou indikátorem pokročilé aterosklerózy a zužují cévní lumen. Naopak kalcifikace média, častěji nacházené u CKD, diabetu mellitu a metabolického syndromu, jsou charakteristické difúzní minerálovou depozicí podél elastických vláken tepen a důsledkem je ztuhnutí tepenné stěny. Mnoho CKD nemocných je i při významném postižení koronárních tepen oligosymptomatických (14). Cévní ztuhnutí je nezávislým prediktorem KV příhod, přispívá k vývoji hypertenze a diastolické dysfunkce, ischemizaci myokardu a progresi CKD. Cévní ztuhnutí je asociováno se stárnutím, obezitou a DM2. V patogenezi hraje roli také lokální působení RAAS v cévách, imunitních buňkách a perivaskulárním tuku, které přispívá k vývoji endoteliální dysfunkce a ztuhnutí cév. Ztuhnutí tepenné stěny je také spojeno s poruchou kostního metabolismu a je také prediktorem renálního rizika. Mluví se o CKD- MBD (poruše kostní a minerálové).

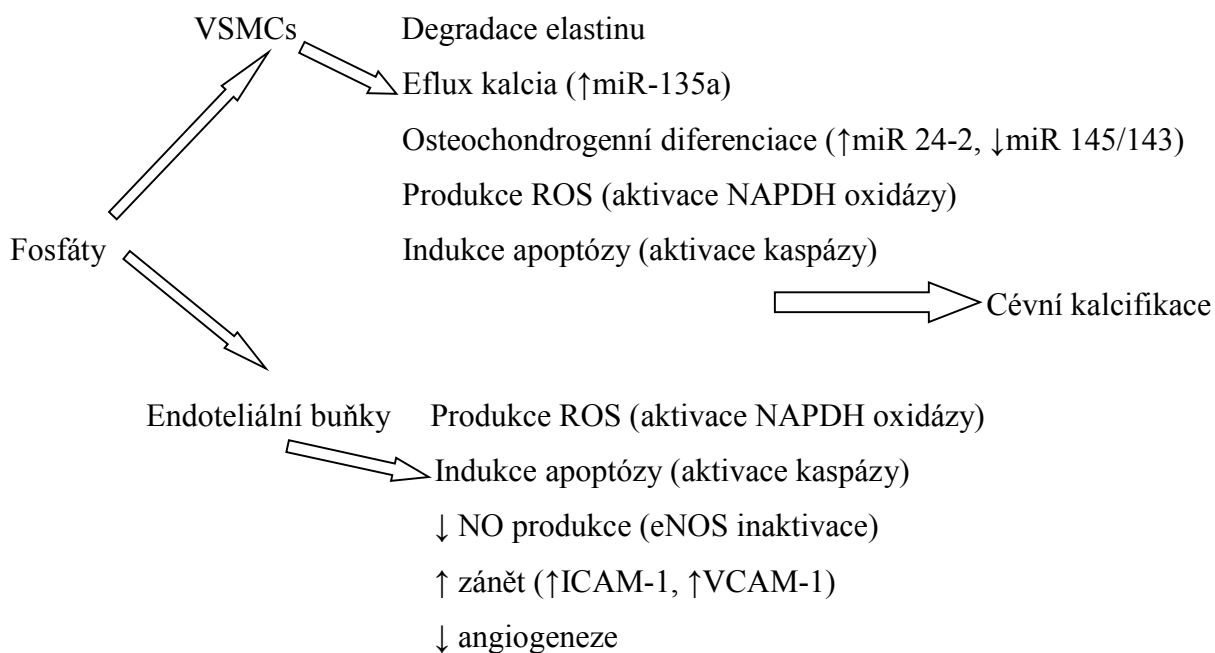
Hyperfosfatémie koreluje s kalcifikací koronárních i periferních arterií i s chlopenními kalcifikacemi u CKD nemocných (16) (Obrázek 3). Fosfáty indukují cévní kalcifikace a urychlují osteogenní transformaci cévních svalových buněk (VSMCs) (23). Transformace VSMCs v buňky podobné osteoblastům přispívá k expresi proteinů asociovaných s kostí a indukuje mineralizaci extracelulární matrix (23). Extracelulární fosfát je transportován cestou sodík-dependentních fosfátových transportérů (PIT1 u lidí, PIT-1 a PIT-2 u hlodavců) (24), čímž up-reguluje osteogenní geny, jako je *Runx2* (runt-related transkripční faktor 2), *Msx2* (Msh homeobox 2), *Osx* (osterix), alkalická fosfatáza a osteopontin (16).

Mechanismus vývoje cévních kalcifikací se podobá procesu kostní mineralizace a jde o přísně regulovaný proces, jehož patofyziologie je multifaktoriální a dosud ne plně objasněná. Cévní kalcifikace jsou u CKD běžné, jsou výsledkem pasivních i aktivních procesů. v nichž hraje roli řada cirkulujících biomarkerů. V patofyziologii VC se uplatňuje nejen precipitace fosfátů a kalcia v extracelulárním prostředí (minerální krok), ale také úzce regulovaný, buňkami řízený proces zahrnující apoptózu, osteochondrogení diferenciaci a degradaci elastinu (buněčný krok). Na počátku vývoje cévních kalcifikací je nejspíše apoptóza buněk hladké cévní svaloviny (VSMC). Apoptotická tělíska z VSMC slouží jako nukleační struktura pro formování kalciových krystalů, čímž je zahájena kalcifikace. Degradace elastinu hraje významnou roli v iniciaci a progresi VC. Je indukována elastázou, metaloproteinázami, cysteinem aj. proteázami. Degradovaný elastin má vysokou afinitu ke kalciumu. Multipotentní cévní kmenové buňky se diferencují v osteochondrogení buňky v reakci na cévní poškození (25).

V procesu tvorby cévních kalcifikací se uplatňují také inhibiční proteiny a promotéry. Mezi promotéry patří: bone morphogenic protein 2 (BMP-2) a aktivátor receptoru pro NF kappa B ligand (RANKL), hyperfosfatémie, hyperkalcémie a za inhibitory považujeme: osteoprotegerin, fetuin-A, osteopontin, magnésium, pyrofosfát, klotho, matrix Gla protein, bone morphogenic protein 7 (26). Fetuin-A inhibuje patologické extraoseální kalcifikace. Snížené hladiny fetuinu-A jsou spojeny s vyšší KV mortalitou u HD nemocných. V experimentu u myši byla kombinace deficitu fetuinu-A, hyperfosfatémie a CKD spojena s 15 násobným zvýšením cévních kalcifikací. Deficit fetuinu-A vedl téměř výhradně ke vzniku kalcifikací intimy (209). Byla popsána inverzní korelace mezi hladinou magnésia a cévními kalcifikacemi (27). Možnými faktory v genezi osteo-chondrogenické transformace jsou také AGEs, chronická CMV infekce, microRNAs, FGF23/alpha-Klotho osa a mnoho dalších. Byla také popsána souvislost mezi oxidačním stresem, hyperfosfatémií a kalcifikací arteriální médie u CKD nemocných (28). Akumulace AGEs přispívá ke ztuhnutí arteriální stěny z důvodu modifikace kolagenu a elastinu.

Mnoho studií v posledních letech popsalo souvislost mezi kostní a cévní mineralizací (osteoporózou) (29, 32). V posledních letech byly objeveny další funkce kosti. Osteoblasty se, díky produkci osteokalcinu, podílejí na regulaci tukového metabolismu, energetické homeostázy, inzulinové sekrece a senzitivity, což je zásadní pro správnou funkci KV systému. (30). Osteokalcin i adiponektin inverzně korelují s arteriálním ztuhnutím a koronární kalcifikací. (32, 33). Leptin, hormon regulující objem tukové hmoty, je silným inhibitorem tvorby kosti a podporuje vývoj cévních kalcifikací (34)

Obrázek 3: Úloha fosfátů v patogenezi cévních kalcifikací



Klinickou diagnózu kalcifikací média nelze provést pouhým fyzikálním vyšetřením. Pravděpodobně jsou přítomné při palpovatelných, špatně stlačitelných tepnách (i manžetou tonometru). Tento manévr je označován jako Oslerovo znamení. V současnosti neexistuje spolehlivý, dostatečně senzitivní a specifický biomarker pro diagnózu VC. Kalcifikace koronárních tepen popisuje Agatstonovo CAC skóre (CACS), které je založeno na součinu plochy kalcifikovaného plaku a koeficientu denzity. Zlatým standardem diagnostiky přítomnosti a míry cévních kalcifikací je výpočetní tomografie: multislice CT a electron-beam CT (MSCT, EBCT) na principu rychlého snímkování srdce (10-20x za sekundu). CACS poskytuje kvantitativní představu o celkovém kalcifikačním postižení koronárních tepen a vyšší CACS predikuje výskyt KV příhody. CACS koreluje s výskytem AIM, syndromu AP, výskytem klaudikací a AO aneurysmat. Toto skóre ale nedokáže rozlišit mezi kalcifikacemi intimy a média. Časná depozice kalcia je současnými metodami prakticky nezobrazitelná (35). Nejčastěji používanou technikou ke stanovení ztuhnutí tepenné stěny je rychlost pulsové vlny (pulse-wave velocity - PWV) (36). Doporučení iniciativy KDIGO z roku 2009 navrhuje k semikvantitativnímu hodnocení VC používat levnou laterální abdominální radiografii a dále echokardiogram k detekci chlopenních kalcifikací u nemocných ve stádiu CKD 3-5 (KDIGO).

Ateroskleróza je chronický zánětlivý proces, na kterém se podílí řada imunokompetentních buněk přítomných v AS lézích. Příčina imunologické aktivace není zcela jasná. V AS plátech jsou přítomné oxidované a/nebo enzymaticky změněné formy LDL (OxLDL) a mrtvé buňky. Studie

ukazují, že zánět zvyšuje intracelulární akumulaci lipidů a tvorbu pěnových buněk, tím narušuje regulaci LDL, což vede k progresi aterosklerózy a cévních kalcifikací. OxLDL působí prozánětlivě a imunostimulačně, aktivují T-lymfocyty a jsou ve vyšších koncentracích cytotoxické. Bakterie a viry byly považovány za možné příčiny imunitní aktivace, ale je obtížné najít přímý důkaz této hypotézy, neboť pokusy s antibiotiky u lidí byly nepřesvědčivé. Mezi přímé příčiny ruptury plaku patří cytokiny (IL-1 β , TNF a lipidové mediátory-leukotrieny), metaloproteinázy (PAPP-A) (37).

1.4. Hypertrofie levé komory

Až 80% pacientů zahajujících hemodialýzu (HD) má koncentrickou nebo excentrickou formu hypertrofie levé komory (38, 55). HLK začíná v časných stádiích CKD a její prevalence stoupá s klesající funkcí ledvin (3). HLK se nejspíše vyvíjí jako kompenzační mechanismus k volumovému a tlakovému přetížení, nakonec ale HLK významně přispívá k nepříznivé prognóze pacientů. Excentrická forma vzniká volumovým přetížením, které vede k úbytku kardiomyocytů; koncentrická forma je důsledkem hypertenze a zvýšeného afterloadu, je zhoršována anémií, hyperparatyreózou a vysokou hladinou angiotensinu II. HLK u nemocných s CKD je typicky doprovázena myokardiální fibrózou, zbytněním cévní stěny arteriol a prořídnutím kapilární sítě, redukcí počtu kardiomyocytů a jejich hypertrofií. Tyto mechanismy urychlují vývoj systolické a diastolické dysfunkce levé komory (LK).

U pacientů s CKD 3-5 byla podle echokardiografie HLK přítomna u 72-89% nemocných (39). HLK má u této populace multifaktoriální patogenezi, kdy spolupůsobí hemodynamické i non-hemodynamické stimuly, které indukují buď vzestup masy levé komory (LVMI) nebo dilataci levé komory (LK). Index LVMI koreluje s věkem, délkou arteriální hypertenze, TK, tlakovou amplitudou a proteinurií, negativně s hladinou hemoglobinu a eGFR. Tlaková amplituda je rozdíl mezi systolickým a diastolickým tlakem. Její velikost určuje hlavně systolický objem a poddajnost cév. Nižší poddajnost cév tlakovou amplitudu zvyšuje. Tlaková amplituda je silným prediktorem zvýšení LVMI, což naznačuje významnou roli ztuhnutí arteriální cévní stěny ve vývoji HLK (58).

Hlavními rizikovými faktory vývoje HLK jsou anémie a hypertenze a ovlivnění těchto rizik může vést ke zmírnění HLK (40). Nezávislými prediktory HLK jsou dále: pohlaví, věk, obezita a diabetes. BMI i obvod pasu nezávisle korelují s LVMI. Obezita je nejvýznamnějším modifikovatelným KV rizikovým faktorem vývoje HLK (41, 42). Nemocní s vyšším LVMI měli vyšší zánětlivé markery a vyšší albuminurii (43).

HLK může přispívat ke zvýšení hladin hs-cTnI/T u nemocných s CKD. Detekovatelné hladiny srdečních troponinů jsou u pacientů s CKD časté, a to i při absenci manifestního KV onemocnění.

Detekovatelný sérový troponin T (cTnT) je nezávisle asociován s HLK, systolickou dysfunkcí LK, se zvýšeným rizikem srdečního selhání a KV úmrtí. Kombinace vysokého CRP a srdečního troponinu-T identifikuje nemocné s koronárním postižením (14), ale také predikuje KV úmrtí u ESRD nemocných. Dalším prediktorem HLK a snížené systolické funkce LK je FGF23 (45). LVMI a diastolická dysfunkce LK nezávisle korelovaly s hladinou 25(OH)D (46).

Již mírné snížená renální funkce má vliv na geometrii levé komory. Subjekty s onemocněním ledvin byly srovnávány s dárci ledvin (eGFR byla srovnatelná). Onemocnění ledvin bylo významným a nezávislým prediktorem LVMI, což může být spojeno s prohypertrofickými faktory, jako je aldosteron (47). HLK se pojí s endoteliální dysfunkcí. CKD nemocní měli oproti kontrolám vyšší hsCRP, nižší FMD (brachial artery flow-mediated dilatation) a vyšší LVMI (48). HLK souvisí s výskytem náhlé srdeční smrti, hlavně z důvodu komorové arytmie nebo snížené systolické funkce LK (49, 50). HLK provází intermyocytární fibróza LK (51). Detekce myokardiální fibrózy byla obtížná, ale nyní je proveditelná cestou akustické denzitometrie (52). Prevalence fibrózy koreluje s rizikem náhlé smrti (7).

U CKD nemocných je zřejmě nejčastější příčinou náhlé smrti kardiomyopatie, která se vyvíjí již v časných fázích CKD (53). Jedná se o souhrn neadekvátní hypertrofie levé komory, intersticiální fibrózy, ztlustění arterií a kapilárního deficitu (54). Frekvence srdeční zástavy je až 100x vyšší u HD nemocných než u obecné populace, zatímco u obecné populace za 80% náhlých úmrtí zodpovídá koronární ateroskleróza (55, 56). Srdeční zástava u HD nemocných přichází častěji bez přítomnosti klinicky manifestní koronární aterosklerózy (57). Multivariantní analýza ukázala, že zvýšený LVMI je také prediktorem progresu do ESRD a úmrtí (58). Hypertrofie levé komory zůstává u nemocných s CKD často nediodagnostikovaná. Nutný je screening rizikových faktorů, časná diagnostika HLK cestou echokardiografie, monitorace HLK a zahájení specifické léčby v časných stádiích CKD.

1.5. Diastolická dysfunkce levé komory

Diastolická dysfunkce LK představuje abnormální relaxaci, plnění nebo poddajnost levé komory, což s sebou přináší nepříznivou prognózu nezávisle na úrovni systolické funkce LK (63). Byly popsány tři typy diastolické dysfunkce LK: 1. Porucha relaxace LK (stupeň I) 2. Pseudonormalizace (stupeň II) a 3. restriktivní plnění (stupeň III). Posuzování plnicích tlaků levé komory umožňuje neinvazivní echokardiografická metoda tkáňově-dopplerovská (TDI – Tissue Doppler Imaging). Srdeční fibróza (která způsobuje arytmiu pravděpodobně arytmogenním mechanismem reentry) a diastolická dysfunkce (jež je důsledkem snížené compliance) jsou

významnými prediktory úmrtí (59, 54). Diastolická dysfunkce LK je u CKD nemocných běžnou KV patologií (55, 60), umožňuje prudký vzestup diastolického tlaku LK při malém zvýšení objemu LK, takže nemocní mají nízký práh pro vznik plicního edému. Při ultrafiltraci během dialýzy mohou tito nemocní prodělat prudký pokles diastolického tlaku v LK při poměrně nízké redukci volumu, čímž vzniká náhlá hypotenze.

Index pulsního tlaku je definován jako: systolický TK – diastolický TK / systolický TK, a reflektuje cévní poddajnost, která koreluje s diastolickou dysfunkcí LK (64). Levá síň je velmi citlivá na volumové přetížení a diastolickou funkci a její rozměr je nezávislým prediktorem KV příhod, úmrtí i progresu CKD. Metaanalýza klinických studií poukazuje na možnost použití rozměrů LS jako prediktoru klinické prognózy u CKD nemocných (65).

1.6. Tradiční faktory kardiovaskulárního rizika u CKD nemocných

1.6.1. Hypertenze, systém renin angiotensin aldosteron, sůl

Arteriální hypertenze se vyskytuje u většiny nemocných s CKD, může být příčinou i komplikací CKD, je klasickým rizikovým faktorem progresu CKD a KV morbidit. Její patogeneze je multifaktoriální a ne zcela objasněná. Asi v 90% případů se jedná o esenciální hypertenzi, kdy přesná příčina není známá. Sekundární hypertenze je u CKD často důsledkem hyperaldosteronismu, spánkové apnoe nebo stenózy renální tepny (66). Byl popsán vztah mezi hypertenzí a zánětem (67). Normální endotel reguluje cévní tonus cestou tvorby vasodilatačního NO pomocí endoteliální NO syntázy (eNOS) (68). CRP i TNF destabilizují eNOS mRNA, čímž snižují produkci NO (69, 70). CRP stimuluje monocyty k tvorbě cytokinů (IL-6, IL-1 β , TNF- α) a endoteliální buňky k expresi molekul ICAM-1 a VCAM-1 (71, 72), což podporuje zánětlivou reakci. Zánět tak může vyvolat endoteliální dysfunkci, což vede ke zvýšení cévní rezistence. Zdravý endotel působí protizánětlivě, neboť cestou NO inhibuje adhezi leukocytů (73). Inhibice eNOS zvyšuje adhezi leukocytů a chemokinů. Také oxidační stres vede k endoteliální dysfunkci, z důvodu reakce superoxidu s NO, za tvorby peroxynitritu (74). Peroxynitrit oxiduje 4-tetrahydrobiopterin (BH₄), kofaktor eNOS, což způsobí, že eNOS produkuje superoxid (namísto NO) (75). Není dosud jasné, zda je zánět příčinou nebo důsledkem hypertenze, může se jednat o obousměrný vliv. Hypertenze senzitivní na sůl (asociována zvláště s CKD, diabetem i obezitou) je indukována methyglyoxalem (MG), což je jeden z hlavních prekurzorů karbonylového stresu a jeho hladiny u CKD jsou zvýšené. MG-indukovanou hypertenzi, zánět, karbonylový a oxidační stres, lze částečně redukovat pomocí ARB (candesartan). (76). Významnou roli ve vývoji hypertenze hraje cirkulace

ve dřeni ledvin. Studie na zvířatech ukázaly, že zvýšený oxidační stres snižuje difuzi NO v této oblasti. (77).

Hypertenze je asociována s mírným vzestupem natremie (78), který stimuluje centrální tlakové receptory, včetně aktivace sympatiku (79) a uvolnění kardiotonických steroidů (79, 80). Analog digitalisu - marinobufagenin, inhibitor Na⁺K⁺ATPázy, je spojen s kardiomyopatií a uremickou kardiální fibrózou u zvířat (81). Protilátky neutralizující marinobufagenin předcházejí poškození srdce u potkanů s CKD (82). U HD pacientů byl zjištěn vztah mezi LVMI a kardiotonikem ouabainem (83). Inhibitor ouabainu - rostafuroxin – v experimentu snižuje oxidační stres, endoteliální dysfunkci a TK, v klinických studiích ale jeho efekt na TK nebyl prokázán (85).

Plazmatické hladiny aldosteronu jsou u CKD zvýšené a aldosteron zvyšuje cévní zánět a srdeční fibrózu (86). Hladina aldosteronu koreluje s incidencí IM a mortalitou u KV pacientů. Podání aldosteronu v experimentu zvýšilo obsah lipidů a zánětlivých buněk v AS plátu, infiltraci monocytů a T lymfocytů v cévách, systémovou zánětlivou reakci a hladinu cirkulujícího cytokinu RANTES. Po aplikaci aldosteronu byl z cév secernován prozánětlivý placentární růstový faktor (PIGF). Aktivace mineralokortikoidního receptoru v lidských koronárních svalových buňkách vyvolala sekreci faktorů podporujících chemotaxi monocytů. Aldosteron podporuje časnou aterosklerózu v místech turbulentního toku krve a podporuje zánět a rupturu plaku cestou PIGF signalizace (87). Aktivace cévního RAAS je prokazatelná v experimentálních modelech obezity a DM2 a je asociována se zvýšením oxidačního stresu a zánětu v cévách. Mineralokortikoidní receptory hrají roli ve vývoji insulinové rezistence, nedostatku NO, endoteliální dysfunkci a cévního ztuhnutí. V aktivaci lokálního RAAS se uplatňují imunitní mechanismy.

Elevace aldosteronu se pojí s cévními kalcifikacemi, které u CKD souvisí s vývojem HLK (393). V experimentu aldosteron stimuluje cévní kalcifikace tím, že cestou mineralokortikoidního receptoru vyvolává transport fosfátů v cévních svalových buňkách. Spironolakton, antagonist MK receptoru, redukuje VC a zvyšuje přežití. Blokáda aldosteronu redukuje cévní kalcifikace díky mechanismům nezávislým na krevním tlaku (88). Inhibice receptoru pro aldosteron pomocí eplerenonu by mohla redukovat cévní tuhost u CKD stádia 3-4 (89). Inhibitory aldosteronu (spironolakton a eplerenon) redukují mortalitu nemocných se srdečním selháním (90). Aktivace RAAS je fibrogenní, zatímco inhibice je antifibrogenní. Tyto účinky byt mohly být u ESRD využity k léčbě HLK, hypertenze a cévních kalcifikací. Antagonisté MK receptorů jsou u běžné populace standardní léčbou nemocných se srdečním selháním, sníženou EFLK a po prodělaném IM. Dlouhodobé účinky léčby kombinací ACEI, ARB a antagonistů MK receptorů u ESRD však dosud nebyly zhodnoceny v randomizovaných kontrolovaných studiích (92).

1.6.2. Albuminurie

Proteinurie (PU) je časným markerem renálního poškození, je rizikovým markerem progresu CKD a nezávislým faktorem KV morbidity a mortality. Mechanismy, kterými albuminurie při zachovalé eGFR zvyšuje riziko úmrtí nejsou zcela jasné. Hypotéza „Steno” uvádí, že proteinurie je markerem cévní endoteliální dysfunkce (93). Troponin T (hs-TnT) jako marker cévní mikronekrózy predikuje stupeň albuminurie (94). Albuminurii provází pokles hladin adiponektinu a zvýšené CRP (95, 96). Výše proteinurie souvisí s hladinou ADMA (asymetrický dimethylarginin), což je prozánětlivý marker inhibující produkci NO a způsobující endoteliální dysfunkci (97). Cirkulující antigen von Willebrandova faktoru (vWF) se vyplavuje při poškození endotelu. Nemocní s albuminurií mají vyšší hladiny vWF oproti kontrolám (99). Také endoteliální dysfunkce měřená ultrazvukem pomocí FMD (flow-mediated dilatation) se pojí s proteinurií (96). Dalším pojítkem mezi PU a endoteliální dysfunkcí může být VEGF. Užití antagonistů VEGF jako inhibitorů angiogeneze u onkologických nemocných bylo spojeno se zvýšením PU a hypertenze (98). I další trombogenní faktory, jako jsou: fibrinogen a tkáňový aktivátor plazminogenu, korelují s úrovní albuminurie (100). Inzulinová rezistence i proteinurie se pojí s aterogenezí. Pacienti s albuminurií měli vyšší inzulinovou rezistenci. U potkanů způsobuje hyperinzulinémie renální vazodilataci a zvýšenou glomerulární filtraci (101).

Ve skupině 16759 osob s normální nebo lehce sníženou eGFR bylo nejvyšší riziko mortality u osob s normální eGFR a albuminurií. Šlo o relativně mladé subjekty s vyšším BMI, TK, HbA1c a vysokou prevalencí DM a metabolického syndromu (102). U pacientů s DM 2 bylo zjištěno, že velikost albuminurie, nikoli snížená eGFR, je asociována se zvýšenou arteriální tuhostí, LVMI a aterosklerózou (103). Multifaktoriální analýzy poukázaly na roli proteinurie v progresi CKD, u diabetiků i nediabetiků (104, 105). Ve studii RENAAL (106) byla bazální proteinurie prediktorem KV příhod, stejně jako ve studiích LIFE (107), HOPE (108) a Framingham (109). Ve studii RENAAL bylo >30% snížení PU spojeno s redukcí rizika dosažení renálního cíle.

K redukci albuminurie jsou obvykle třeba vyšší dávky ARB než ke kontrole TK. Myším s DM 2. typu po jednostranné nefrektomii byl podáván valsartan nebo placebo. Neléčené myši vyvinuly albuminurii, mesangiální expanzi a zvýšenou renální expresi TGFβ1, PAI-1, kolagenu IV a fibronektinu. Myši léčené valsartanem měly nižší albuminurii a markery renální fibrózy. (110). Většina renoprotektivního účinku ARB je zprostředkována snížením PU a snížení PU o polovinu bylo spojeno s poklesem rizika KV příhod a vývoje ESRD o polovinu (106).

1.6.3. Obezita

Obezita, tato epidemie 21. století, vede k vyššímu výskytu CKD a ESRD. Tuková tkáň je aktivním endokrinním orgánem. Různé adipokiny se podílejí na renálním poškození modulací endoteliální funkce, indukci oxidačního stresu a zánětu, stimulací sympatické nervové aktivity, modulací kostní remodelace a účasti ve vývoji anémie. Rezistin, adiponektin a leptin jsou hlavními cytokiny tukové tkáně, jsou spojeny s insulinovou rezistencí a cévním poškozením (111, 112). Obezita přináší zvýšené riziko DM 2, malignit, hypertenze, KV chorob, dyslipidémie, spánkové apnoe. Procento obézních nemocných s CKD 2-5 během posledních 10 let stoupá. Pro rutinní hodnocení se používá body mass index (BMI). Hranice BMI 30-35 kg/m² je považována za mez únosnosti k transplantaci ledviny. Léčba a prevence obezity je možností, jak zlepšit celosvětový nárůst výskytu CKD (113). Zajímavým poznatkem je, že u dialyzovaných nemocných je paradoxně obezita spojena s lepší prognózou. V observační studii COSMOS u dialyzovaných nemocných byl váhový úbytek nebo přírůstek (<1% nebo >1% tělesné hmotnosti) silně asociován s vyšším rizikem mortality, ovšem pouze pro neobézní kategorie a nemocné s podváhou (114). V prospektivní studii u CKD s eGFR<60mL/min byl sledován relativní energetický příjem a složení potravy. Nemocní s vyšším energetickým příjmem neměli zvýšené riziko KV mortality. Naopak zvýšená konzumace sacharidů byla asociována s vyšším rizikem KV mortality. (115)

1.6.4. DM 2. Typu, inzulinová rezistence

Inzulinová rezistence (IR) zvyšuje riziko KV chorob. Význam IR je potvrzen vzestupem prevalence obezity. Premenopausální ženy mají nižší riziko KV chorob ve srovnání s muži, ale tato ochrana je ztracena při obezitě a insulinové rezistenci. IR je spojena se zánětlivou odpovědí. Detailní patofyziologické mechanismy nejsou objasněny a svou roli zde jistě hrají systém RAAS, aktivace sympatiku, modulátory incretinu (např. DPP-4) a imunitní mechanismy (116). Ve vývoji inzulinové rezistence a obezity se uplatňuje oxid dusnatý (NO) svými antiobezitogenními a inzulin-senzitizujícími účinky. NO má četné biologické role, včetně pleiotropních, jako je regulace synaptické transmise, agregace trombocytů, interakce leukocytů s endotelem, imunitní funkce, aterogeneze, angiogeneze (118). Různé izoformy NOS mají různé role (119); NOS1 (neuronální) a NOS3 (endoteliální) např. působí v systémové regulaci TK a regulaci orgánového průtoku, zatímco NOS2 (inducibilní) spíše působí při zabíjení patogenů a v zánětlivých procesech (120, 121). NO působí antiobezitogenně díky zvýšení oxidace tuků v kosterním svalu, játrech a tukové tkáni, naopak snižuje syntézu lipidů v játrech. NOS2 zřejmě podporuje glukoneogenezu a ovlivňuje inzulinovou sekreci. NO také přímo ovlivňuje vazbu a uvolnění kyslíku z hemoglobinu a je schopen

zvýšit krevní průtok ve tkáních s malou koncentrací kyslíku (122). Úkolem NO je tedy modulovat O₂ gradient v buňkách a tkáních, díky regulaci funkce hemoglobinu a cestou inhibice spotřeby O₂ v mitochondriích (123). Chronická expozice NO může vyvolat v mitochondriích změny, které mohou reprogramovat buňky nebo tkáň k vyššímu metabolickému výkonu (124).

Hlavní úlohou NO je ale regulace krevního průtoku a jeho původní název byl EDRF (endoteliální relaxační faktor). NO je syntetizován v endotelu NO syntázou (NOS3) a difunduje do cévní stěny; to vede ke vzestupu cGMP a k relaxaci cévy (125). Dostupnost NO je však snížena u obezity a diabetu (126). Dostupnost NO je dána rovnováhou mezi jeho tvorbou a degradací, nízké hladiny NO u obezích mohou být dány nízkou expresí NOS, snížením NOS aktivity nebo reakcí NO s kyslíkovými radikály. Exprese NOS3 je u obezity a diabetu snížena z více příčin. Uplatňuje se zde vliv TNF α , ADMA, malých 27-nt RNA, snížení kofaktorů, jako je L-arginin (126). NO je klíčovým faktorem v regulaci metabolismu, tělesného složení a inzulínové senzitivity. Středozevní dieta bohatá na resveratrol je spojena se snížením KV morbidity. V klinické studii resveratrol vyvolal vasodilataci, snížil endoteliální dysfunkci cestou zvýšení aktivity NO syntázy, zvýšil hladinu tetrahydrobiopterinu (kofaktor NOS) a snížil cévní oxidační stres (127).

1.6.5. Dyslipidémie

Aterogenní dyslipidémie, typická pro DM 2. typu a metabolický syndrom je charakterizována typickou triádou: nízký HDL-cholesterol, zvýšené triacylglyceridy a malé denzní LDL částice, které snadno podléhají oxidaci. Malé denzní LDL částice a oxidované LDL částice působí infiltraci monocytů, migraci a proliferaci VSMCs, apoptózu endoteliálních buněk, infiltrují cévní stěnu, vycytávají makrofágy a mají nízkou afinitu k LDL-receptoru.

Sacharidy jsou hlavními determinanty hladin triacylglyceridů (128). Dieta s vysokým obsahem sacharidů se pojí s KV rizikem. Redukce TAG a LDL-cholesterolu byla popsána m.j. při zvýšení vlákniny ve stravě, zvýšení příjmu omega-3 mastných kyselin (včetně ořechů), zřejmě díky jejich antioxidačním schopnostem (129). Restrikce sacharidů zlepšuje dyslipidémii i bez váhového úbytku a bez omezení příjmu nasycených tuků. Komplexní polysacharidy, vláknina a fyzická aktivita snižují TAG, zvyšují HDL-cholesterol a omezují tvorbu malých denzních LDL (130). U nemocných s aterogenní dyslipidémií byla vyšší inzulínová rezistence a zánětlivé markery, tyto nemocní měli nižší hladiny B12 a vyšší hladiny homocysteinu. Hypertriglyceridémie koreluje s inzulínovou rezistencí, zvýšenými hladinami IL-6, TNF-alpha a hsCRP (131).

U většiny nemocných s CKD je obvykle celkový cholesterol a LDL cholesterol v normě, s výjimkou nemocných s nefrotickým syndromem a pacientů léčených peritoneální dialýzou.

Aterosklerotické KV příhody tvoří jen 30% všech KV příhod u CKD nemocných. Přesto ukázaly intervenční studie (zvláště SHARP) a metaanalýzy propořční snížení KV rizika spojené se snížením LDL cholesterolu u nemocných s CKD (s výjimkou CKD 5) (132).

1.7. Netradiční KV rizikové faktory

1.7.1. Uremické toxiny, glomerulární filtrace

Uremické toxiny mohou vyvolat zánět, oxidační stres a endoteliální dysfunkci, jsou významným KV rizikovým faktorem u CKD, mohou ovlivňovat hladiny a složení lipoproteinů (např. oxidaci a karbamylyaci) a tak zvyšovat KV toxicitu lipoproteinů u CKD nemocných. (132). V databázi EUTox je nyní uvedeno 152 uremických toxinů (<http://eutoxdb.odeesoft.com/index.php>). Uremické toxiny dělíme do 3 kategorií: 1. Malé, ve vodě rozpustné látky, $MW \leq 500$ Da (např. urea, kreatinin, guanidiny). 2. Střední molekuly ($MW > 500$ Da), prototypem je β 2-mikroglobulin, leptin, PTH, FGF23, AGEs, AOPPs. 3. Látky vázané na protein (fenoly, indoly aj.). Za hlavní uremické toxiny považujeme fosfáty, FGF23, PTH, AGEs, indoxyl sulfát a para-cresyl sulfát. P-cresylsulfát je prototypem toxinu vázaného na proteiny. P-cresylsulfát i p-cresylglucuronid (PCG) nezávisle korelují s mortalitou u CKD 2-5D (133). 3-indol octová kyselina (IAA) je nezávislým prediktorem mortality a KV příhod, její hladiny korelují s markery zánětu a oxidačního stresu (CRP, malondialdehyd). V lidských endoteliálních buňkách IAA cestou NF- κ B aktivuje prozánětlivou cyklooxygenázu-2.

Nejen snížená, ale i zvýšená GFR je rizikovým faktorem KV chorob. Studie Matiss u téměř 3000 osob z obecné populace zjistila, že eGFR <90 a ≥ 109 mL/min nezávisle zvyšovala riziko KV morbidity i mortality (134). Průřezová studie RENIS-T6 sledovala 1521 osob z obecné populace, bez anamnézy KV onemocnění, CKD, diabetu, bez albuminurie. GFR v nejvyšším kvartilu bylo nezávisle asociováno se zvýšeným výskytem karotických plaků a HLK. (135). U 4128 osob byly prediktory rychlého poklesu GFR (>3 mL/min/rok) zánětlivé a prokoagulační markery: CRP, IL-6, počet bílých krvinek, fibrinogen, D-dimer, plasmin-antiplasmin komplex a sérový albumin. 26% nemocných mělo rychlý pokles GFR a tento nálezn byl nejsilněji asociován s poklesem s-albuminu (136).

1.7.2. CKD-metabolická a kostní choroba, FGF23 a Klotho, fosfatémie, parathormon, aktivní vitamin D

CKD-MBD je systémová porucha minerálového a kostního metabolismu v důsledku chronického onemocnění ledvin, která se projevuje jednou nebo více z následujících komplikací: abnormality v metabolismu kalcia, fosforu, parathormonu, vitaminu D, abnormality v kostním obratu a mineralizaci kosti, kalcifikace cév a měkkých tkání (137).

V kontextu CKD existuje těsná asociace mezi minerálovou dysbalancí a rizikem celkové a KV mortality a morbidity. Minerálová dysbalance se vyvíjí časně a je obtížně léčitelná. Cévní manifestace CKD-MBD začíná cévním ztuhnutím, zvýšením karotické IMT (intima-media thickness) a cévními kalcifikacemi (VC). Výsledky velkých studií (databáze Medline, EMBASE a Cochrane 1980-2007) ukázaly zvýšené riziko mortality pro vyšší fosfor, kalcium a PTH. KV riziko rostlo od prahu $>1,76$ mmol/l pro fosfor a $>476,1$ pg/ml (52,4 pmol/l) pro PTH (138). Vyšší $\text{Ca} \times \text{P}$ součin ($\geq 4,4$ mmol²/l²) je asociován s HLK, oxidačním stresem, mikrozánětem, hyperhomocystinémií a hyperlipidémií (139).

Fosfáty jsou induktory VSMC apoptózy a osteochondrogenní diferenciaci. Hyperfosfatémie indukuje cévní kalcifikace a snížení tvorby aktivního vitaminu D, což vede k aktivaci RAAS spolu s defekty přirozené imunity. Riziko úmrtí lineárně stoupá s každým vzestupem fosfatémie o 0,16 mmol/l (140). Křivka závislosti mezi sérovými hodnotami fosforu a mortalitou u dialyzovaných má „J“ tvar, tzn. vyšší riziko mortality je spojeno nejen s vysokými, ale také nízkými hodnotami fosfatémie. Tento fenomén je korelátem proteinové malnutrice, která je dalším rizikovým faktorem mortality u CKD. Vyšší hladiny sérové ALP a intaktního PTH (markerů kostního obratu) korelují se zvýšenou mortalitou HD nemocných (141, 142). Ve zvířecím modelu byla vysokofosfátová dieta spojena s vyšším TNF α , oxidačním stresem a malnutricí, cévními kalcifikacemi a předčasným úmrtím. Léčba lantan karbonátem tyto změny oslabila. V kultuře lidských cévních svalových buněk fosfáty zvyšovaly expresi TNF α (143). Hyperfosfatémie zrychluje progresi CKD a zvyšuje mortalitu, proto byla vydána klinická doporučení ke snížení fosfátové zátěže. V praxi je však jejich dodržování obtížné, zvláště dietní restriktce fosfátů a užívání fosfátových vazačů. Běžná je špatná compliance a nedostatečná informovanost pacientů (144)

Tradičně byla patogeneze CKD-MBD vysvětlována deficitem 1,25-dihydroxyvitaminu D, následnou elevací PTH a dysbalancí metabolismu kalcia a fosfátů (145). Tvorbu PTH v příštinných těliscích stimuluje snížení ionizovaného kalcia (spíše než zvýšení fosfátů). Hyperfosfatémie, deficit vitaminu D a sekundární hyperparatyreóza byly považovány za hlavní faktory vysokého KV rizika CKD nemocných (146, 147). Po objevení fibroblastového růstového faktoru 23 (FGF23) se tato

teorie značně změnila a recentní literatura popisuje FGF23 jako nejčasnější sérovou abnormalitu CKD-MBD (148).

FGF23 je zřejmě klíčovým regulátorem CKD-MBD a pojítkem mezi CKD-MBD a KV onemocněním. U CKD hladina FGF23 stoupá již od stádia 3 (eGFR < 60 ml/min), a to dříve než se změní hladiny PTH, 1,25(OH)₂D, nebo fosfátů (149). Podílet se může jeho retence v organismu při poklesu eGFR a/nebo nadměrná produkce. Hladina FGF23 koreluje s PTH, s fosfatémií, kalcitriolem a eGFR (150). Hladina FGF23 není ovlivněna hemodialýzou a žádná korelace nebyla popsána mezi FGF23 a kostní denzitou (151). Hladiny Klotho a 1,25vitD klesají s poklesem GFR, zatímco hladiny FGF23 a PTH stoupají. Hladina FGF23 stoupá od eGFR<47 mL/min, zatímco hladina PTH od eGFR<34 mL/min. (152).

FGF23 náleží do široké rodiny fibroblast growth faktorů (podobně jako kyselý FGF a basický FGF), které se podílejí na proliferaci a diferenciaci buněk hladké svaloviny cév (VSMCs) a podporují angiogenezi. Sekreci FGF23 stimuluje hyperfosfatémie, vysoký příjem fosfátů, vysoká hladina kalcitriolu a PTH. FGF23 byl popsán v roce 2000 při výzkumu autosomálně dominantní formy hypofosfatemické rachitidy (153). Vyšší FGF23 při normální funkci ledvin vede k hypofosfatémii, deficitu kalcitriolu a k osteomalacii. Naopak u myši bez FGF23 exprese, se vyvine hypervitaminoza D, hyperfosfatémie a kalcifikace měkkých tkání. Nemocní s autosomálně dominantní formou hypofosfatemické rachitis (ADHR), mají několik různých FGF23 mutací, díky kterým je protein rezistentní k proteolytickému štěpení. Amino-terminální část FGF-23 (aa 1-24) je hydrofóbní a zřejmě slouží jako signální peptid umožňující sekreci FGF23 do krevní cirkulace. Jeho karboxy-terminální část (180-251) má pouze částečnou shodu ve složení aminokyselin s ostatními členy FGF rodiny.

Již před 50 lety bylo popsáno, že s poklesem GFR stoupá exkrece fosfátů díky PTH (154). FGF23 je dalším významným fosfaturickým hormonem. Je tvořen hlavně osteocyty a osteoblasty, v reakci na zvýšenou hladinu fosfátů a vitaminu D (155). FGFs působí cestou FGF receptorů (FGFRs), což jsou tyrosinkinázy kódované 4 různými geny (*FGFR1–FGFR4*) (156). FGF23 podle *in vitro* a *in vivo* studií interaguje se všemi 4 FGFRs (157), má ale atypickou heparin-vázající doménu, takže se váže na FGF23 s nízkou afinitou. FGFRs jsou všudypřítomné, ale typickými cílovými orgány FGF23 jsou ledviny a příštítná tělíska. Koreceptor Klotho je nezbytný k indukci FGF23-specifických signálních mechanismů (158). Rozpustný Klotho je hormon podporující fosfaturii nezávisle na FGF23 (159).

Hlavním cílem FGF23 je FGF receptor-Klotho komplex v ledvinách, kde FGF23 indukuje močovou exkrece fosfátů cestou přímé down-regulace sodík-dependentních fosfátových

kotransportérů (NPT2a a 2c) v renálním proximálním tubulu (160, 161). Druhou významnou rolí FGF23 je snížení hladiny 1,25(OH)2D cestou suprese 1- α -hydroxylázy (klíčový enzym aktivace vitamínu D) a stimulaci katabolické 24-hydroxylázy v proximálním tubulu ledvin (160).

Vazba FGF23 na cílové buňky vyžaduje ko-expresi všudypřítomného receptoru FGF -1c a α Klotho (158). Klotho je transmembránový protein, který je především exprimován v ledvinném proximálním a distálním tubulu, v příštítných tělískách, ale také v chorioidním plexu v mozku (159).

Klotho je nezbytným kofaktorem FGF23 a anti-aging faktorem. Klothodeficitní a FGF23-deficitní myši vykazují zrychlené stárnutí, zkrácené dožití, akcentovanou aterosklerózu a cévní kalcifikace, zvýšený oxidační stres a renální fibrózu. Naopak zvýšená exprese Klotho u myši redukuje aortální kalcifikace, klotho inhibuje fosfáty indukovanou kalcifikaci VSMC in vitro. Podle některých autorů Klotho není přítomno v aortě ani ve VSMCs (162). Jiné studie naopak expresi mRNA Klotho ve VSMCs a aortě potvrzují (163). Bylo ukázáno, že exprese Klotho v aortě je u CKD snižena, zatímco plazmatické Klotho bylo zvýšené (164). Arteriální exprese Klotho je v malé kvantitě dokazatelná PCR reakcí, ale je nedetekovatelná pomocí imunohistochemie nebo Western blotting (165). Další studie jsou nutné ke zjištění jak je regulována aortální exprese Klotho u CKD nemocných. U pacientů s CKD je snížení α -Klotho nejspíše sekundární při elevaci FGF23 a sníženém 1,25(OH)2D (oba tyto markery suprimují expresi α -Klotho v ledvinách). Spolehlivé in vivo stanovení hladiny klotho však dosud není dostupné, takže spojení vysokého FGF23 a nízkého klotho u CKD je zatím jen teorií.

FGF23 je přímým regulátorem Na-Cl kanálu (NCC) v distálním renálním tubulu. Tento kanál hraje klíčovou roli v reabsorbci sodíku. Myši bez FGF23 nebo bez Klotho exprese mají nižší expresi tohoto kanálu, což vede ke ztrátám sodíku, dehydrataci a poklesu TK. Naopak, injekce rekombinantního FGF23 normálním myším vede ke zvýšení NCC exprese, retenci sodíku, hypertenzi a srdeční hypertrofii. Léčba blokátorem NCC, chlorothiazidem, zrušila FGF23 indukovanou hypertenzi (166).

Dalším významným cílem pro FGF23 jsou příštítná tělíska. V pokusu u zvířat FGF23 snížil expresi a sekreci PTH (171). Pacienti s CKD mají typicky sekundární hyperparatyreózu s vysokými hladinami FGF23, což naznačuje, že u nich FGF23 významně nesnižuje sekreci PTH. Příčinou je možná snížená exprese komplexu Klotho-FGFR1 v hyperplastických příštítných tělískách, ev. částečná rezistence tkání v urémii na působení FGF23, což bylo ukázáno ve zvířecím modelu (172). Ve zvířecím modelu stimuloval parathormon expresi FGF23 v kosti (173). PTH přímo ovlivňuje hladiny kalcitriolu a fosfátů, které poté působí na sekreci FGF23. Detailní mechanismus regulace mezi FGF23 a PTH je dosud nejasný.

Zvýšené hladiny FGF23 jsou spojeny s endoteliální dysfunkcí a ztuhnutím tepen u CKD. Ve zvířecím modelu CKD s vyšší hladinou FGF23 byla zjištěna zhoršená cévní dilatace a snížená produkce NO. V endotelu těchto zvířat byla detekována vyšší hladina superoxidu. Zdá se tedy, že FGF23 zvyšuje superoxid, snižuje dostupnost NO a způsobuje endoteliální dysfunkci v aortě. FGF23 i asymetrický dimethylarginin (ADMA) jsou spojeny s progresí CKD. U 940 nemocných s CKD predikovaly hladiny FGF-23 a ADMA výskyt renálních příhod. Byla nalezena nezávislá kompetitivní interakce mezi FGF-23 a ADMA v predikci renálních příhod. Zdá se tedy, že FGF-23 se může uplatňovat v dysregulaci systému NO.

Léčba protilátkami proti FGF23 zvyšuje 1,25(OH)₂D v séru potkanů s CKD (167). Vitamin D zpětnou vazbou reguluje produkci FGF23. Podání 1,25(OH)₂D₃ stimuluje tvorbu FGF23 díky vazbě na FGF23 genový promotér a díky indukci FGF23 mRNA exprese v kostních buňkách (168). Myši bez receptorů pro vitamin D mají nedetekovatelné hladiny FGF23 (169). U dialyzovaných nemocných zvýšila intravenózní injekce vitaminu D hladiny FGF23 (170). První epidemiologická souvislost mezi FGF23 a mortalitou byla popsána v roce 2008 u nemocných zahajujících dialyzační léčbu (174). Ve studii CRIC (CKD 2–4) a studii HOST (CKD 4-5) byly hladiny FGF23 také silně a nezávisle asociovány s mortalitou (175). Ve studii HOST korelovaly hladiny C-terminálního FGF23 s rizikem infarktu myokardu a amputace dolní končetiny, V multivariantní analýze byl FGF23 prediktorem KV prognózy, zatímco 1,25(OH)₂D a PTH nikoli. FGF23 zřejmě zvyšuje fosfáty indukovanou cévní kalcifikaci podporou osteoblastické diferenciace VSMCs cestou ERK1/2 cesty.

Studie u hemodialyzovaných i v predialyzační fázi CKD ukázaly nezávislou asociaci FGF23 a hypertrofie levé komory (176). Ve studii CRIC (CKD 2–4) (177) byl vyšší ct-FGF23 asociován se sníženou ejekční frakcí LK a vyšší prevalencí excentrické i koncentrické HLK. U dialyzovaných nemocných se vzestupem FGF23 klesá EFLK (178). Klotho však nejspíše není v srdci exprimováno (177). FGF23 v srdci zřejmě působí přímo i nepřímo, cestou hormonální regulace v ledvinách, suprese ACE2, Cyp27b1 a α -klotho, které regulují RAAS, produkci 1,25(OH)₂D a transport iontů v myokardu (179). Další možností je vliv FGF23 na hypertrofii kardiomyocytů cestou PLC- γ (fosfolipáza C) signalizace, která je dependentní na FGFR aktivaci, ale nezávislá na Klotho. FGF23 zřejmě aktivuje FGF/ α -Klotho koreceptory v ledvinách, což nepřímo vede k HLK a KV mortalitě cestou aktivace RAAS. FGF23 je inhibitorem exprese ACE2 v ledvinách (180), což brání degradaci Angiotensinu I a II. Naopak Angiotensin II blokuje expresi α -Klotho v ledvinách (181). Kalcitriol inhibuje transkripci reninu a blokuje RAAS, ale stimuluje produkci FGF23 v kosti

(182). Léčba kalcitriolem zvyšuje cirkulující FGF23, a tak má konfliktní účinky na myokard, což možná vysvětluje neschopnost VDRAAs zmírnit HLK ve studii PRIMO (183).

Studie u potkanů po 5/6 nefrektomii ukázala, že injekce FGF23 zhoršují HLK a tento efekt je redukován podáním blokátoru FGF-receptoru (223). V jiné studii však podání protilátky proti FGF23 nevedlo k redukcí HLK (184). FGF23 a Klotho zřejmě ovlivňují cévní reaktivitu, buď přímo cestou endoteliálních buněk nebo nepřímo cestou ovlivnění endotelin-1-dependentní sympatické aktivity. (185).

Souvislost mezi CKD a KV onemocněním může být způsobena zánětlivými cytokiny (TNF- α , IL-6, CRP) (Obrázek 4). Cytokiny podporují vznik a vývoj aterosklerózy a jsou spojeny s rychlým úbytkem renální funkce. Cytokiny poškozují endotel, což vede k ischemickému KV postižení a mineralizaci média cévní stěny. U 3879 osob byla prokázána souvislost mezi zánětlivými cytokiny a FGF23 (reprezentujícím marker CKD-MBD). Naopak, ani PTH ani fosfáty nebyly se zánětem asociovány, což podtrhuje význam FGF23 (186). Jiným možným spojením mezi FGF23 a zánětem u CKD je leptin. Leptin je se zánětem silně spojen a injekce leptinu u myši stimulovala produkci FGF23, což naznačuje, že leptin je mediátorem mezi FGF23 a zánětem („CVD risk triangle“) (187)

U CKD koreluje vysoká hladina FGF23 se závažností aterosklerózy a výskytem cévních kalcifikací, urychluje progresi CKD a je asociována se špatnou prognózou (150). Studie u nemocných s CKD 3-4 stádia popsala asociaci FGF23 s mortalitou, zahájením RRT a srdečním selháním, variabilita hladiny FGF23 během 2 let byla malá (188). Hladiny FGF23 a fosfatémie byly nezávisle asociovány s progresí koronárních kalcifikací u HD nemocných (189). Zvýšené FGF23 bylo silněji asociováno s rizikem srdečního selhání než s AS příhodami u nemocných s CKD 2-4 (190). U pacientů, kteří podstoupili koronární angiografii, byla zjištěna nezávislá korelace hladin FGF23 s rozsahem koronární stenózy, s objemem AS plátu a obsahem kalcia (191). V jiné studii hyperfosfatémie korelovala se závažností koronárních kalcifikací, zatímco hladina FGF23 nikoli (192). FGF23 urychluje fosfáty indukovanou cévní kalcifikaci, ale mechanismus jeho působení v cévách je nejasný.

Také u populace s normální renální funkcí jsou zvýšené hladiny FGF23 spojeny s vyšší LVM a se zvýšenou mortalitou (193). V souboru 3107 osob sledovaných 10,5 roku, byl FGF23 asociován s celkovou mortalitou a srdečním selháním (194). Byla zjištěna významná korelace mezi hladinou FGF23 a kalcifikací chlopní, ale nikoli mezi FGF23 a LVMI nebo koronárními kalcifikacemi (195). Celkové tělesné skóre aterosklerózy (MR angiografie) nezávisle korelovalo s FGF23 (196). U nemocných po transplantaci ledvin FGF23 nezávisle korelovalo s markery napětí levé komory: MR-

proANP, NT-proBNP a prekursorem vasopresinu – kopeptinem. FGF23 bylo nezávisle asociováno se zvýšeným rizikem KV mortality i celkové mortality (197).

Hladiny FGF23 lze snížit dietní restrikcí fosfátů a fosfátovými vazači. U zdravých dospělých snížení fosfátů v dietě snižuje hladiny FGF23 (199). Naopak u CKD nemocných má restrikce fosfátů na FGF23 malý efekt (200). Kalcium-obsahující fosfátové vazače FGF23 nesnižují (201). Naopak, sevelamer hydrochlorid i lantan karbonát u CKD hladiny FGF23 snižují (202, 203), není ale známo, zda je tento efekt spojen se snížením KV rizika. Hladiny FGF23 mohou být sníženy pomocí protilátek, specifických inhibitorů (204) produkce a orgánových účinků FGF23 (205), dále léčbou cinacalcetem spolu s nízkými dávkami analog vitamínu D (206).

Kalcium senzitivní receptor (CaR) je exprimován ve tkáních regulujících kalciový metabolismus (příštitná tělíska, štítná žláza, ledvina, kost a střevo), ale také v endoteliálních buňkách cév a VSMC. Kalcimimetika (např. cinacalcet hydrochlorid) zvyšují citlivost receptoru pro kalcium a snižují sérový parathormon u pacientů s CKD. Cinacalcet snižuje hladiny PTH, fosfátů i FGF23 u CKD 5 (207). Kalcimimetika možná zmírňují cévní kalcifikace nepřímo (zlepšením kontroly PTH, kalcia a fosfátů), ale také přímým účinkem na cévní buňky (208).

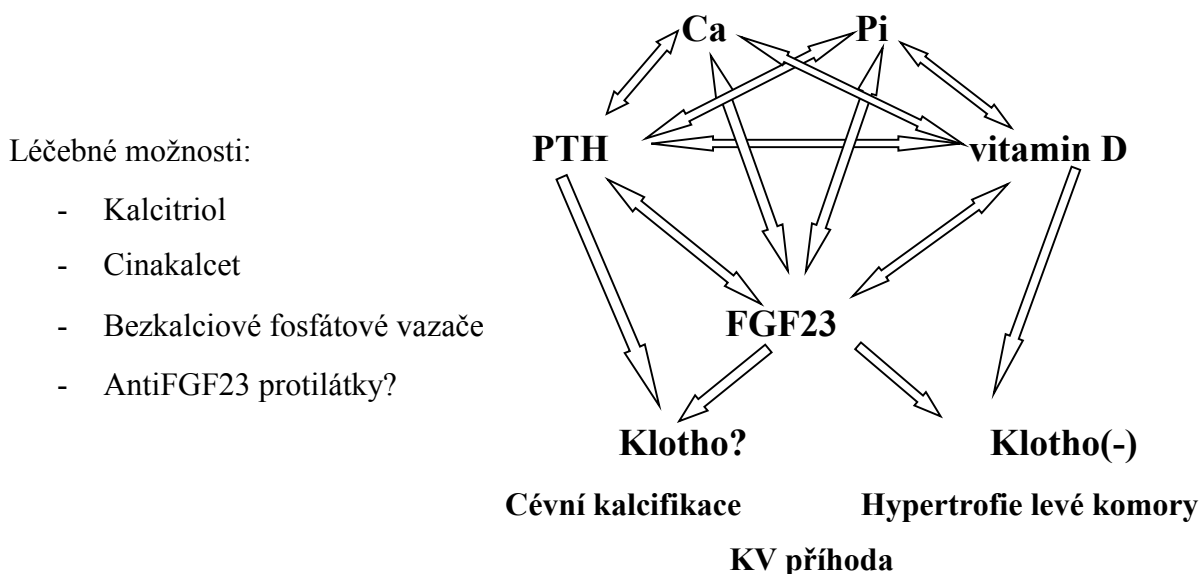
Aktivátory receptoru pro vitamin D (VDRA agonisté) se využívají především k léčbě sekundární hyperparatyreózy. Mnoho klinických studií popsalo, že léčba VDRAAs zlepšuje přežití dialyzovaných nemocných (210, 211). Tento fenomén se může zdát paradoxní, neboť vitamin D zvyšuje hladiny FGF23 a zvýšený FGF23 je asociován s vyšší mortalitou. Studie u zvířat i lidí ukázaly, že malé dávky VDRAAs snižují hladinu FGF23 (215). Vliv vitamínu D na vývoj cévních kalcifikací také není zcela jasný, vitamin D vede k up-regulaci osteoblastických markerů a zvyšuje transport kalcia do VSMCs (213). Jiné studie však popisují inhibiční efekt vitamínu D na cévní kalcifikace (214). Ve zvířecím modelu chrání vitamin D myokard před HLK (216). V klinické studii PRIMO (183) však parikalцитol podávaný CKD nemocným s HLK neredukoval LVMI ani nezlepšil diastolickou funkci.

Shalhoub et al. ukázali, že protilátky proti FGF23 zmírnily sekundární hyperparatyreózu ve zvířecím modelu, ale zvýšily cévní kalcifikace a riziko úmrtí, zřejmě díky hyperfosfatémii (184). Z toho vyplývá, že ovlivnění hladin FGF23 u CKD musí být velmi dobře vyladěno. Ideální by byla tkáňově specifická (selektivní) blokáda FGF23 receptoru.

Parathormon a FGF23 normalizují fosfatémii až do stádií CKD 4–5 (214). U pokročilejších stádií CKD FGF23 není schopen zabránit hyperfosfatémii, zřejmě díky sníženému počtu viabilních nefronů (219). Parathormon i FGF23 působí fosfaturicky. Není jasné, jaký je podíl inhibičního vlivu FGF23 a stimulačního vlivu PTH na syntézu kalcitriolu, ale byly popsány nízké koncentrace

kalcitriolu za přítomnosti vysokého PTH, což může naznačovat význam FGF23. FGF23 pomáhá snižovat fosfatémii, ale zhoršuje deficit 1,25 (OH)₂D₃, což podporuje vývoj sekundární hyperparatyreózy. FGF23 pomáhá vysvětlit bifázické KV účinky vitamínu D u CKD. Nižší dávky vit D snižují a vyšší dávky zvyšují výskyt KV onemocnění. Vitamin D zvyšuje sekreci FGF23 a je naopak inhibován zvýšeným FGF23.

Obrázek 4: Souvislosti mezi minerálovou dysbalancí, FGF23 a KV komplikacemi



CKD je nejčastějším z klinických stavů, kdy je hladina FGF23 zvýšena (220). FGF23 je klíčovým regulátorem metabolismu fosfátů a kalcitriolu (221). Hladina FGF23 nezávisle koreluje s progresí CKD, s HLK, endoteliální dysfunkcí, aterosklerózou a mortalitou u CKD a obecné populace. Studie naznačují, že FGF23 má přímý efekt na KV systém a že snížení FGF23 by mohlo zlepšit prognózu CKD nemocných. Není zcela jasné, jakým mechanismem způsobuje FGF23 KV komplikace (222). Vysoká hladina FGF23 zřejmě působí cestou specifických mechanismů, nezávisle na své roli regulátora fosfátové homeostázy (223).

Aktivní vitamin D

Aktivní 1,25 (OH) vitamin D je dle současných názorů považován za hormon. Působí cestou jaderného steroidního receptoru pro vitamin D (VDR), který je v lidském těle lokalizován ve více než 30 typech buněk. Vitamin D₃ se tvoří v kůži po osvětlení slunečním světlem (UV záření), méně významným zdrojem je potrava (prakticky výhradně tučné mořské ryby). Kalcidiol (25-hydroxycholecalciferol) po hydroxylaci v játrech představuje zásobní formu vitamínu D₃, z nějž se v ledvinách a dalších orgánech) pomocí 1- α -hydroxylázy tvoří aktivní metabolit – kalcitriol.

Kalcitriol má v organismu mnohočetné úlohy, které přesahují tradiční cílové tkáně (trávicí ústrojí, kostní metabolismus). Epidemiologické studie ukázaly souvislost mnoha onemocnění s nízkými hladinami vitamínu D. Byl navržen termín „syndrom deficitu vitamínu D“ s následujícími charakteristikami: hladiny kalcidiolu <25 ng/ml a aspoň dvě z následujících komplikací: osteoporóza, KV onemocnění, hypertenze, autoimunitní onemocnění, některé karcinomy (tlusté střevo, prostata, mamma), chronická únava a chronická bolest.

Klasickou rolí vitamínu D je zajištění kalciové homeostázy. Kalcitriol zvyšuje absorpci Ca a Pi ze střeva a jejich resorpci z kosti. Kalcitriol je ale produkován a působí také parakrinně v řadě orgánů, kde se uplatňují jeho účinky protizánětlivé a antiproliferační (protinádorové působení a snížení proliferace myocytů, redukce remodelace myokardu a HLK). Vitamin D snižuje produkci reninu (224), má účinky imunosupresivní (při autoimunitních chorobách) a protiinfekční (indukuje expresi cathelicidinu – tělu vlastního antibiotika). Agonisté VDR mají ve zvířecím modelu protektivní efekt na architekturu glomerulu a antiproteinurický efekt. Cílovou buňkou pro pozitivní účinky kalcitriolu je nejspíše podocyt (225). Studie ukazují, že kalcitriol je kardio- a renoprotektivní, a to díky svým protizánětlivým, antiproliferačním a RAAS blokujícím účinkům (226). Nízké hladiny kalcitriolu mohou být spoluzodpovědné za ztuhnutí cévních stěn tepen (227), za HLK, srdeční selhání a horší prognózu pacientů (229). Nízké hladiny kalcitriolu urychlují vývoj sekundární hyperparatyreozy.

Odhaduje se, že asi 1 bilion osob na světě má deficit nebo insuficienci vitamínu D. Prevalence deficitu kalcitriolu u CKD je nejspíše ještě vyšší než prevalence anémie a je zjišťován již v časných stádiích CKD (150). Snížení tvorby aktivního vitamínu D (např. cestou FGF23) může být reakcí na retenci fosfátů v organismu (i při dosud normální fosfatémii). Širšímu použití kalcitriolu brání obava z toxicity vitamínu D, která je ale vzácná a souvisí s hyperkalcémií. Předávkování u člověka by hrozilo při pravidelném příjmu > 40.000 IU/den. Ke snížení hyperkalcemizujícího efektu byla vyvinuta analoga kalcitriolu (např. parikalcitol), která méně stimuluje absorpci kalcia a fosfátů ze střeva a kosti.

Klasicky se kalcitriol a jeho analoga v nefrologii používají k léčbě SHPT pro jejich supresivní efekt na příštitná tělíska. Observační studie u hemodialyzovaných pacientů popisují snížení mortality u pacientů léčených VDRA. Další zlepšení mortality přináší léčba parikalcitolem. VDRA možná tlumí vývoj cévních kalcifikací a ztuhnutí a působí regresi HLK (230). Jeho podávání dialyzovaným nemocným bylo spojeno s poklesem KV mortality, a to bez ohledu na hodnoty CaxP součinu (210). Doporučená dávka vitamínu D je 600-2000 IU/den (231) a ideální hladina kalcidiolu (zásobního vitamínu D) je asi 40-70 ng/ml (232). V souboru 1099 CKD nemocných byly

průměrné koncentrace 25(OH)D a 1,25(OH)₂D: 21 ± 10 ng/mL, resp. 20 ± 11 pg/mL. V multivariantsní analýze byl nejnižší tercil kalcitriolu asociován s nejvyšším rizikem úmrtí i zahájení RRT. Tyto asociace byly oslabeny po adjustaci na plazmatický FGF23. Nebyla zjištěna korelace mezi hladinou 25(OH)D a klinickými výstupy (233).

Různé léky s aktivitou vitamínu D jsou užívány ke korekci deficitu vitamínu D, ke zlepšení kostní choroby a sekundární hyperparatyreózy. Na výběr je přirozený vitamin D nebo syntetická analoga vitamínu D. Kalcitriol má nejvyšší hyperkalcemizující účinky. Parikalciol, analog vitamínu D₂, byl vyvinut k supresi PTH u CKD, má omezený hyperkalcemizující efekt a je účinný i v léčbě pokročilé sekundární hyperparatyreózy. Potkanům po 7/8 nefrektomii byl intraperitoneálně podáván kalcitriol, parikalciol nebo alfacalcidol. Všechny VDRA preparáty zabraňovaly vývoji HLK a snižovaly expresi ANP a BNP. Paricalciol jako jediný udržoval normální parametry myokardiální fibrózy (celkový kolagen, kolagen I, TGFβ1 a MMP1) (238). Klinické studie s parikalciolem ukazují částečně pozitivní renální účinek, ale neprokazují významné kardiální účinky (239). Mechanismy, kterými 1,25(OH)₂D₃ reguluje cévní tonus a srdeční funkci jsou nejasné. Myši s inaktivním receptorem pro vitamin D (VDR) měly nižší dostupnost oxidu dusnatého (NO) díky snížené expresi endoteliální NO syntázy. To vedlo k endoteliální dysfunkci, ztuhnutí tepen, remodelaci aorty a zhoršení systolické a diastolické srdeční funkce, a to bez závislosti na změnách v systému RAAS (241).

Epidemiologické studie naznačují asociaci mezi nízkou hladinou vit D a rizikem KV chorob, ale kauzální vztah nebyl prokázán. Ani klinické studie a metaanalýzy zatím nepodalý přesvědčivé důkazy o tom, že by léčba vit D zlepšovala KV prognózu. Velké klinické studie jsou potřeba k porozumění účinkům a úskalím léčby vitamínem D (240). Vitamin D je možná biomarkerem životního stylu, neboť nezdravý a sedavý způsob života se pojí s deficitem vitamínu D (242).

Léčba CKD-MBD spočívá tradičně v kontrole biochemických parametrů. Jsou potřeba studie zkoumající klinické výstupy. Recentně byly publikovány dvě randomizované kontrolované studie (PRIMO a EVOLVE). Ve studii EVOLVE byl cinacalcet srovnáván s placebem u 3883 HD nemocných se sekundární hyperparatyreózou. Primárním složeným cílem bylo: úmrtí, IM, nestabilní angina pectoris, srdeční selhání nebo ICHDK. Primární cíl nastal u 48,2% pacientů na cinacalcetu a u 49,2% v placebo skupině. Cinacalcet tedy významně nesnížil riziko úmrtí a KV příhod. Sekundární analýza ukázala pokles KV příhod o 21% medikace (243). Dalších 18 randomizovaných studií posuzovalo vliv kalcimimetik na mortalitu a morbiditu nemocných s CKD 5D (celkem 7446 účastníků). Cinacalcet měl malý nebo žádný efekt na celkovou mortalitu, malý vliv na KV mortalitu, ale působil preventivně proti paratyreoidektomii a hyperkalcémii. (244). Ve

studii PRIMO bylo sledováno 227 nemocných s CKD 3-4 a HLK, kteří byli randomizováni k podání paricalcitolu nebo placebo. Primárním cílem byla změna v LVMI po 12 měsících, výsledky byly negativní, ale hospitalizace pro KV příčinu byly redukovány ve skupině s paricalcitem. (245).

Bezkalciové fosfátové vazače mají menší riziko cévních kalcifikací než kalciové vazače. Sevelamer snižuje absorpci AGEs, bakteriálních toxinů a žlučových kyselin a může tak redukovat zánětlivé, oxidační a aterogenní stimuly, navíc ke své klasické hypofosfatemizující aktivitě. Má zřejmě příznivé pleiotropní účinky na endoteliální dysfunkci. Sevelamer u diabetiků s CKD významně snížil HbA1c, AGEs, FGF3, celkový a LDL cholesterol (oproti kalcium karbonátu). Sevelamer u nemocných s CKD zvýšil „flow-mediated“ vazodilataci (marker zlepšení endoteliální funkce). Studie „the INDEPENDENT-CKD“ v predialyzačním CKD zjistila, že sevelamer (oproti kalcium karbonátu) snížil mortalitu a oddálil zahájení dialýzy. Také studie „the INDEPENDENT-HD“ u nemocných zahajujících dialýzu, ukázala lepší přežití u sevelameru (246). Ve zvířecím modelu CKD podávání sevelameru snížilo fosfatémii, FGF23, zlepšilo PWV a diastolickou funkci. Hladina fosfátů (ale nikoli FGF23) byla asociována s diastolickou funkcí LK a LVMI (247). Léčba sevelamerem u nemocných s CKD snížila fosfaturii a sérové FGF23, ale nebyly rozdíly v hladině klotho, vitamínu D, nebo KV prognóze. Nedošlo ke zlepšení LVM, funkce LK nebo tuhosti tepen (248). Různé fosfátové vazače mají různý vliv na minerálový metabolismus. Podle studie CALMAG kalcium acetát/magnesium karbonát (CaMg) a sevelamer srovnatelně snižují hladiny i FGF23 (249). Studie COSMOS u 6797 nemocných ukázala, že všechny fosfátové vazače (s výjimkou aluminiových) snižují celkovou mortalitu i KV mortalitu (250). Fosfátové vazače s obsahem kalcia však zvyšují výskyt cévních a chlopenních kalcifikací. Z toho důvodu jsou vhodnější non-kalciové, non-aluminiové vazače (251).

1.7.3. Oxidační a karbonylový stres. Mikrozánět

Oxidační stres je definován jako nerovnováha mezi působením reaktivních forem kyslíku (ROS) a přirozeným antioxidačním systémem deaktivace těchto působků nebo opravením výsledného poškození. Tato nerovnováha vede k oxidaci molekul a tkáňovému poškození (252). Oxidační stres působí toxicky cestou tvorby peroxidů a volných radikálů, které poškozují všechny části buňky (proteiny, lipidy i DNA), výsledkem je deplece ATP, apoptóza nebo nekróza buněk. OS hraje roli v mnoha patologických procesech, včetně aterosklerózy a je rizikovým faktorem progresu CKD a KV chorob. U CKD je rovnováha posunuta směrem k oxidačnímu stresu. Prooxidační aktivita je zvýšena z důvodu věku, diabetu, retenci uremických toxinů, chronického zánětu a faktorů

asociovaných s RRT. Antioxidační obrana je snižena, což může být dáno vyšším věkem, deficitem v antioxidačních mechanismech (např. snížená hladina vitamínu C při restrikci ovoce a zeleniny, ztráty vitamínů během dialýzy), snížená intracelulární hladina vitamínu E, snížená koncentrace selenu a deficit v GSH scavenger systému). Erytrocyty mají významnou antioxidační kapacitu díky glutathion peroxidáze (253). Pokud je tento enzym inhibován, erytrocyty vykazují pomalejší eliminaci volných radikálů. Není jasné, zda zahájení pravidelné hemodialýzy zlepšuje nebo zhoršuje oxidační stres (254). Studie srovnávala prooxidační a antioxidační markery u nemocných s CKD, u HD a PD nemocných. Markery lipidové peroxidace byly vyšší u HD nemocných oproti ostatním skupinám, reaktivní karbonyly byly vyšší u peritoneálně dialyzovaných (PD) nemocných. Antioxidační enzymy a vitamin E byly sniženy již u nedialyzačních stádií CKD, k dalšímu snížení došlo u HD pacientů. Zdá se, že snížení antioxidační aktivity u CKD nemocných je dáno poklesem GFR a zároveň dialyzační procedurou (255)

Hlavním zdrojem ROS za fyziologických podmínek je mitochondriální respirační řetězec (oxidativní fosforylace). Oxidační systém fagocytů produkuje ROS cestou univalentní redukce molekulárního kyslíku (O^2). Jedná se o odpověď na stimulaci, tzv. respirační vzplanutí. ROS jsou používány imunitním systémem k zabíjení patogenů. Aktivované fagocyty produkují ROS i RNS, například superoxid ($\bullet O^-$)², oxid dusnatý ($\bullet NO$) a zvláště reaktivní peroxynitrit ($ONOO^-$). ROS hrají klíčovou roli v procesu buněčné signalizace, proces se nazývá „redox signalizace“.

Mezi enzymy produkující superoxid patří: xanthin oxidáza, NADPH oxidázy a cytochromy P450. Systém NADPH-oxidázy, napojené na buněčné membrány redukuje O^2 na superoxidový anion (O_2^-), který je konvertován na hydrogen peroxid (H_2O_2). O_2^- i H_2O_2 jsou prekurzory produkce mocnějších oxidantů, jako jsou: reaktivní nitrogenové látky, hydroxylový radikál (OH^-), chlorované oxidanty (OCl^-), chloraminy ($RNH-Cl$). ROS jsou uvolňovány společně s prozánětlivými cytokiny, které dále zvyšují tvorbu oxidantů.

Při poklesu renální funkce dochází k retenci prozánětlivých cytokinů, AGEs a ROS a naopak je snižena produkce antioxidačních látek. Oxidační stres (OS) nejspíše vychází z urémie „per se“ a roli zde hraje léčba Fe, dietní restrikce, uremické toxiny a acidóza, srdeční selhání a volumové přetížení, bioinkompatibilita dialyzačních membrán, případně kontaminace dialyzátu a infekce cévního přístupu k dialýze (257). OS působí m.j. i aktivaci matrix- metaloproteináz (258). ROS slouží jako signální molekuly, které slouží k prevenci nebo oddálení řady chronických chorob. Nízké hladiny ROS zlepšují systémové obranné schopnosti organismu, vyvoláním adaptivní odpovědi. To je označováno jako mitochondriální hormesis nebo mitohormesis. Krátkodobý oxidační stres tedy může být účinný v prevenci stárnutí (259).

Vysoké hladiny ROS poškozují tkáň a podporují stárnutí. Oxidační stres poškozují proteiny cestou oxidace aminokyselin, dochází k zesílení proteinů a vzniku agregačních produktů, rezistentních k proteolýze. Jedním z markerů oxidace proteinů jsou AOPPs (advanced oxidation protein products), které popsal Witko-Sarsat (260). AOPPs mají mnoho společného s AGEs. AOPPs se pojí s markery monocytární aktivity, jsou mediátory zánětu. Úzká souvislost mezi AOPPs a AGEs vedla ke konceptu karbonylového stresu, kde se oxidace společně s glykací spolupodílí na formování AGEs (261). Byla zjištěna významná korelace mezi AOPPs a zánětlivými markery (orosomukoid, fibrinogen, PAPP-A) (262).

Metalické katalyzátory: Kovy, jako železo, měď, chrom, vanad a kobalt jsou schopné vytvořit redox kruh, ve kterém může být kovem přijat nebo odevzdán jeden elektron. Tato akce katalyzuje produkci ROS. Pokud se v organismu tyto kovy nacházejí ve volné formě, mohou zvyšovat oxidační stres. Tyto kovy zřejmě indukují Haber-Weissovou reakci, kdy se z hydrogen peroxidu stává hydroxylový radikál, ten pak může způsobit ireverzibilní modifikaci aminokyselin a jiných molekul. Působením ionizačního záření a reakcemi H_2O_2 katalyzovanými kovy vznikají tandemové léze DNA. Poškození DNA vede ke stárnutí a vyššímu riziku rakoviny. Během peroxidace lipidů vznikají nestabilní hydroperoxydy, rezultující z řetězových reakcí mezi nenasycenými MK. F2-isoprostany jsou primární produkty oxidace kyseliny arachidonové a slouží jako markery útoku volných radikálů na membránové fosfolipidy in vivo. I jiné organické látky, např. chinony, mohou působit jako nemetalické katalyzátory, neboť mohou tvořit redox kruh, a vést k tvorbě ROS.

Oxidační stres přispívá k řadě onemocnění. Podílí se na vývoji malignit, obezity, diabetu, Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby, aterosklerózy, srdečního selhání, infarktu myokardu, autismu, chronického únavového syndromu, dialyzační amyloidózy a malnutrice (263, 264). Oxidační stres (dle Hartmanovy teorie o volných radikálech) urychluje proces stárnutí. Tuto teorii podporují experimenty u modelových organismů, jako je *Drosophila melanogaster* (265). U nemocných s Alzheimerovou demencí se v lyzozomech mozkových buněk kumulují peroxidované lipidy a proteiny. Oxidace LDL v cévním endotelu je prekurzorem tvorby AS plátu. Oxidační stres hraje roli v ischemické kaskádě při oxidačním reperfučním poškození následujícím po hypoxii. Tato kaskáda se podílí na vzniku cévních mozkových příhod a srdečních příhod. Ischémie-reperfúze (I/R) je oxidační poškození charakterizované vasokonstrikcí, apoptózou a zánětem. Oxidační stres (OS) je meč s dvojím ostřím: je významný v přirozené obraně organismu, ale je nadměrně aktivován u různých patologických stavů.

Diagnostika: Existují tři metody testování přítomnosti oxidačního stresu: (1) přímé měření ROS; (2) měření poškození biomolekul a (3) detekce hladin antioxidantů. Přímé měření ROS je obtížné, neboť ROS jsou velmi nestabilní, mají krátký poločas (vteřiny). Proto se většinou používá měření poškození proteinů, DNA, RNA, lipidů aj. biomolekul, což je sice metoda nepřímá, ale vzhledem ke stabilitě většiny markerů tkáňového poškození spolehlivá. Jde o lipidové peroxidační produkty (např. akrolein, malonyldialdehyd, 4-hydroxynonenal, F2-isoprostany), produkty pokročilé oxidace lipidů, specifické protilátky proti oxidovanému LDL, oxidačně modifikované proteiny (AOPP). Je také možné měřit hladiny antioxidantů, např. katalázy a superoxid dismutázy. Dále existují testy k měření antioxidační kapacity některých biomolekul a potravin, jako jsou enzymatické antioxidační systémy (obsah SOD a GSH v erythrocytech, plasmatické hladiny GSH-Px), non-enzymatické antioxidanty (plasmatické hladiny vitamínu C, obsah GSH a vitamínu E v erythrocytech) a zánětlivé proteiny (CRP, albumin).

Oxidační stres a zánět jsou hluboce propojeny, neboť různé volné radikály jsou tvořeny fagocyty jako odpověď na zánětlivé stimuly. Naopak oxidační stres může stimulovat zánětlivou odpověď. Mezzano et al. popsali korelaci mezi proteiny akutní fáze a markery oxidačního stresu u HD nemocných (266). Zánět je definován jako lokalizovaná protektivní odpověď vyvolaná poškozením tkání, která slouží k lokalizaci a odstranění zánětlivého stimulu i poškozené tkáně. Akutní zánětlivá odpověď (reakce) je významným patofyziologickým fenoménem a je spojena se zvýšenou aktivitou prozánětlivých cytokinů (267). Pokud zánět trvá delší dobu - chronická zánětlivá reakce - vede k nepříznivým důsledkům, jako je zvýšený katabolismus svalové hmoty a dalších tkání, poškození endotelu a ateroskleróza. Zánět je rizikovým faktorem KV morbidity a mortality asociované s renální insuficiencí (268). 30- 50% HD nemocných má zvýšené hodnoty zánětlivých markerů (CRP, IL-6). Příčiny chronického zánětu jsou multifaktoriální a zahrnují m.j. komorbiditu, oxidační stres, infekce, obezitu, genetické, imunologické faktory a ev.faktory spojené s dialýzou

OS i zánět se podílejí na endoteliální dysfunkci. Myeloperoxidáza z leukocytů působí v tepnách jako NO oxidáza, čímž přispívá ke snížené dostupnosti NO a zhoršené relaxaci hladkých svalů závislé na NO. U CKD nemocných byla popsána zvýšená aktivace polymorfonukleárů. Aktivace PMNs a sekrece MPO tedy může být klíčovým spojením mezi zánětem, oxidačním stresem a endoteliální dysfunkcí u CKD. Zvýšení počtu leukocytů a hladin MPO v krvi koreluje s postižením koronárních tepen u pacientů s normální renální funkcí (270). U nemocných s CKD byla popsána korelace zvýšených zánětlivých markerů s hladinami PIGF a EN-RAGE (271). Endotel je asi největším zdrojem a zároveň cílem ROS. Endoteliální funkci u lidí lze měřit pomocí

hemodynamické odpovědi na acetylcholin (Ach) na předloktí. Injekce zvyšujících se dávek zdravým subjektům nebo pacientům s koronárním postižením vykazuje jasný vztah mezi dávkou a vasodilatační (VD) odpovědí. Tato VD odpověď predikuje výskyt KV příhod. Vysoké dávky vitamínu C (intraarteriálně) zvyšují VD odpověď na Ach. Jednou z nejvýznamnějších reakcí v endotelu je produkce NO z L-argininu, kontrolovaná NO syntázou, jejímž kofaktorem je tetrahydrobiopterin. Pokud je tetrahydrobiopterin oxidován, syntéza NO je potlačena a NO syntáza začne sama působit jako oxidační enzym, produkující superoxidový anion. (272). Antioxidanty, např. vitamin C a GSH, rekonvertují tetrahydrobiopterin do neoxidovaného stavu, a tak normalizují syntézu NO. Podání L-argininu ke zvýšení syntézy NO je problematické, protože chloridová sůl L-argininu je acidifikační činidlo. Endoteliální dysfunkci mohou napomáhat různé endogenní inhibitory NO syntázy. Nejvýznamnějším je asymetrický dimethyl arginin (ADMA). Pokud je jeho obsah v endotelu vysoký, produkce NO je snížena. Syntéza NO u ESRD je navíc velmi nízká kvůli ateroskleróze (zmenšení endoteliálního povrchu) a malé dostupnosti L-argininu.

K prevenci škodlivých účinků ROS mají organismy k dispozici přirozené enzymatické a neenzymatické antioxidantní systémy. Superoxid dismutáza (SOD) urychluje dismutaci O_2^- na H_2O_2 , je to první linie enzymatické antioxidantní obrany. Kataláza redukuje H_2O_2 na vodu. Selen obsahující glutathion peroxidáza (GSH-Px) redukuje všechny organické lipidové peroxidy (273). Nejaktivnějším non-enzymatickým antioxidantem je samotný GSH, který je scavengerem pro H_2O_2 , OH^- a chlorované oxidanty. Vitamin E chrání buněčnou membránu tím, že vytváří málo reaktivní tokoferolový radikál. Vitamin C přímo vychytává O_2^- a OH^- . Zánětlivé proteiny, jako je ferritin, transferrin a albumin vykonávají non-enzymatickou antioxidantní roli cestou sekvestrace kovových iontů.

Chronický oxidační stres a zánět vedou ke snížené aktivaci cytoprotektivního transkripčního faktoru Nrf2. Bardoxolone methyl (také známý jako "RTA 402") je syntetický triterpenoid a induktor Nrf2 cesty, která by měla redukovat oxidační stres a zánět. Studie REATA sledovala diabetiky s pokročilou CKD, kteří užívali bardoxolon nebo placebo. ESRD se vyvinulo u 43 vs. 51 nemocných, 27 vs. 19 zemřelo z KV příčin a 96 vs. 55 vyvinulo srdeční selhání (ve větvi s bardoxolonem vs. v placebo větvi). Studie byla předčasně ukončena na doporučení bezpečnostní komise. V bardoxolon skupině významně narostlo eGFR, TK a ACR, klesla tělesná hmotnost, oproti placebo skupině. Bardoxolon nesnížil riziko ESRD a KV mortalitu (274).

Konečné produkty pokročilé glykace (AGEs) vznikají vlivem karbonylového stresu nebo cestou neenzymové glykace. Karbonylovým stresem rozumíme akumulaci reaktivních karbonylových sloučenin (RCOs), které jsou prekursorem AGEs/ALEs v plazmě a

tkáních. Zvýšené hladiny AGEs působí nepříznivě různými mechanismy. Mezi přímé účinky AGEs patří modifikace proteinů způsobující změnu struktury, vlastností a funkce, např. ztuhnutí původně elastické tkáně. AGEs dále účinkují přes receptory, především RAGE, který spouští zánětlivé mechanismy (291). Reaktivní karbonyly (RCOs) jsou oxidační produkty karbohydrátů, lipidů a aminokyselin. Typickými RCOs jsou: glyoxal, methylglyoxal, arabinóza, glykoaldehyd, 3-deoxyglukoson a dehydroaskorbát. Neenzymová glykace probíhá v několika fázích tzv. Maillardovy reakce. Sled glykačních reakcí je zahájen vazbou aldehydové skupiny redukujícího cukru a aminoskupiny proteinu za vzniku labilního aldiminu typu Schiffovy báze (*časné produkty glykace*). Tvorba Schiffovy báze probíhá rychle a k dosažení rovnováhy dochází v průběhu několika hodin. Tato reakce je reverzibilní. Schiffova báze pak pomalu během několika dní podléhá chemickému přesmyku za vzniku stabilnějšího *přechodného produktu glykace*, tzv. Amadoriho produktu, který má charakter ketoaminu. Amadoriho produkty jsou rovněž do jisté míry reverzibilní, i když rovnováha je značně posunuta ve směru jejich tvorby. Ustáleného stavu je dosaženo během několika týdnů. Amadoriho produkty jsou reaktivní látky. Za týdny a měsíce nezávisle na přítomnosti glukózy vznikají z Amadoriho produktů konečné produkty pokročilé glykace (advanced glycation end-products, AGE). Tyto procesy jsou ireverzibilní. Stanovení produktů glykace Amadoriho typu je vhodným ukazatelem dlouhodobé koncentrace glukózy. Běžně se stanovuje glykovaný hemoglobin a glykované proteiny. Mezi AGEs patří např. CML, pentosidin, pyrralin, imidazolon, glyoxal-lysin dimer (GOLD) a methylglyoxal-lysin dimer (MOLD). Pentosidin je u CKD nemocných výrazně zvýšen a používá se jako spolehlivý marker pro AGEs (277).

Hladiny RCOs, AGEs a ALEs jsou při chronické urémii v plazmě zvýšené. Urémie je charakteristická irreverzibilní, neenzymatickou modifikací proteinů pomocí RCOs. Markery zánětu, oxidačního a karbonylového stresu se zvyšují s progresí CKD, po transplantaci se částečně snižují (278). Peroxidace lipidů polynenasycených mastných kyselin (např. kyseliny arachidonové) také vytváří RCOs (např. glyoxal, malondialdehyd). Tyto reaktivní RCOs reagují s proteiny a tvoří tak ALEs (např. malondialdehyde-lysin, hydroxynonenal). Konečně RCOs také vznikají během myeloperoxidázou katalyzovaného metabolismu aminokyselin L-serinu a L-threoninu (např. akrolein a glykoaldehyd).

Karbonylový stres je důsledkem oxidačního stresu nebo vzniká z neoxidačních příčin, např. z deplece thiolů (279). Karbonylový stres u CKD vychází ze zvýšené tvorby RCOs při oxidačním stresu, kdy jsou sacharidy a lipidy modifikovány pomocí ROS. Vztah mezi oxidačním a karbonylovým stresem je dále podpořen nálezy, kdy sérové hladiny pentosidinu korelují

s oxidačními markery, jako je dehydroaskorbát a AOPP. Hladiny RCOs v uremické plazmě narůstají bez souvislosti s hladinami glukózy a lipidů. Druhá hypotéza karbonylového stresu v urémii spočívá ve snížené clearance nebo detoxifikaci RCOs. RCOs mají poměrně nízkou molekulovou hmotnost, a tak jejich vylučování může záviset na renální funkci. Kromě cesty eliminace ledvinami existuje řada enzymatických pochodů k detoxikaci RCOs (aldosa reduktázy, aldehyd dehydrogenázy, glyoxaláza). Alterace GSH homeostázy může poškodit detoxikaci RCOs a zvýšit tvorbu AGE/ALE.

RCOs mají přímé patologické účinky: kovalentně modifikují matrix proteiny a iniciují různé buněčné odpovědi. AGEs po interakci se svým receptorem spouští tvorbu NFkappaB a mitogen-activated protein kináz (MAPKs), které hrají roli v apoptóze buněk (279).

Jedním z hlavních prekurzorů karbonylového stresu je methylglyoxal (MG), jehož hladiny u CKD jsou zvýšené. Tato látka indukuje na sůl senzitivní hypertenzi. Expozice lidských endoteliálních buněk methylglyoxalu zvýšila syntézu mRNA a proteinů pro VEGF. MG-indukovanou hypertenzi, zánět, karbonylový a oxidační stres, lze částečně redukovat pomocí ARB (candesartan) (280). Akumulace AGEs a ALEs je důsledkem karbonylového stresu. AGEs jsou irreverzibilními produkty glykoxidace. Peptidy modifikované AGEs byly v séru nemocných s DM 2. typu poprvé popsány skupinou Makita et al. v roce 1991 (281). AGEs tvoří řada fluorescentních i nefluorescentních látek, které vznikají v komplexních reakcích. AGEs fluorescence koreluje s hladinou CML. Fluorescence je však nespecifická a může signalizovat přítomnost neznámých AGEs majících fyziologické účinky.

Ledviny jsou zodpovědné za vylučování AGEs, takže jejich akumulace u CKD je částečně dána snížením renální funkce. Přes 90% pentosidinu a CML v uremické plazmě však bylo nalezeno ve frakci albuminu, takže za jejich akumulaci není zodpovědná jen snížená renální clearance. Další příčinou je nejspíše zvýšená de novo produkce způsobená oxidačním stresem a kumulace reaktivních prekurzorů, jako jsou di-carbonyly.

AGEs se vážou na specifický receptor (RAGE). Další receptory pro AGEs jsou např. : SR-A, OST-48 (AGE-R1), 80 K-H fosfoprotein (AGE-R2), Galektin -3 (AGE-R3), přičemž některé zřejmě hrají roli spíše v odstraňování AGEs . Specifické receptory RAGE jsou důležitými regulátory cévního zánětu a aterosklerózy (282). RAGE je transmembránový receptor z rodiny imunoglobulinů o MW 45-55kD, skládá se z extracelulární domény obsahující ligand-vázající doménu, jednoduchou hydrofobní transmembránovou α -šroubovici a krátkou cytosolovou doménu, klíčovou pro RAGE signalizaci (284). RAGE je multiligandovým receptorem, může vázat AGEs, členy S100/kalgranulinové prozánětlivé rodiny, amyloidový- β peptid, HMGB1 a jiné (283).

Aktivace RAGE spouští buněčně specifickou signalizaci, tvorbu ROS a aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B. To vede k up-regulaci prozánětlivých mediátorů, adhezních molekul a dysfunkčnímu buněčnému fenotypu (284).

U nemocných se sníženou renální funkcí se RAGE kumulují a jsou prokazatelné v několika variantách (285). sRAGE (soluble RAGE) je cirkulující formou RAGE (286). sRAGE může být kompetitivním inhibítozem vazby ligandů na RAGE, a tak oslabit následnou zánětlivou odpověď. Cirkulující sRAGE může negativně odrážet aktivitu RAGE (287). sRAGE může být indikátorem subklinického zánětu a aterosklerózy. Jeho potenciál jako biomarkeru musí být vyhodnocen v dalším výzkumu.

Interakce mezi RAGE a jeho ligandy vede k aktivaci prozánětlivých genů a k řadě chorob, jako jsou: komplikace diabetu mellitu, atherotrombóza, imunitní a zánětlivá onemocnění, stárnutí, rakovina a neurodegenerativní choroby (287). AGEs hrají významnou roli ve vývoji akcelerované aterosklerózy u nemocných s diabetem a / nebo s CKD. Přitahují mononukleáry a stimulují buněčnou proliferaci. AGEs se kumulují v mesangiu i v nodulárních lézích u diabetické nefropatie, v procesu stárnutí a během řady degenerativních chorob. AGEs/ALEs byly imunohistochemicky prokázány ve ztlustělé neointimě. AGEs se uvnitř AS plátu vážou na plazmatické proteiny, interagují s receptory makrofágů a indukují výdej cytokinů a růstových faktorů, indukují endoteliální dysfunkci, tlumí aktivitu NO. AGEs také modifikují LDL, takže je hůře odstranitelný LDL receptory. V AS plátech byly nalezeny depozita CML, makrofágů a CRP. AGEs a karbonylový stres se zřejmě podílejí i na patogenezi abnormální geometrie a funkce LK u ESRD (288). Karbonylový stres přispívá i k vývoji komplikací CKD. Dialyzační amyloidóza je destruuující onemocnění kostí a kloubů, kdy jsou histologicky přítomna depozita β 2-mikroglobulinu. Amyloidová depozita jsou obklopena makrofágy a kostní resorbci. Amyloidové plaky reagují s anti-AGE (CML, pentosidin a imidazolon), anti-ALE (malondialdehyd-lysin a hydroxynonenal-protein adduct) i s protilátkami proti RAGE.

Tvorba AGEs/ALEs není specifická pro CKD, ale může se objevit i při cévním poškození z mechanických či metabolických příčin. Není zcela jasné, zda jsou AGEs/ALEs v patogenezi cévního poškození aktivními elementy nebo jen náhodnými svědky, ale první možnost je pravděpodobnější. AGE/ALEs modifikované proteiny in vitro vykazují řadu biologických účinků (Tabulka 2). Spouštějí zánětlivou odpověď, stimulují chemotaxi monocytů, sekreci cytokinů z makrofágů, sekreci kolagenázy ze synoviálních buněk, osteoklastickou resorbci kosti, proliferaci buněk hladké cévní svaloviny a agregaci trombocytů. Fyziologická úloha AGEs není zcela objasněna. Podle některých autorů sérové hladiny AGEs u dialyzovaných nemusí být indikátorem KV prognózy a není jasné, zda jsou sérové AGEs epifenomémem nebo odráží lepší nutriční stav

(290). Je možné, že plazmatické koncentrace AGEs jsou jen malou frakcí celkového obsahu AGEs v organismu a že sérové hladiny neodrážejí změny v AGEs poolu. V budoucnu je vhodné se zaměřit na změny tkáňových a intracelulárních AGEs.

EN-RAGE, neboli kalcium vázající protein S100A12, neboli kalgranulin C je přirozeným prozánětlivým ligandem pro RAGE, tvoří ho 91 aminokyselin, celková MW je 10,4 kD. S100A12 lze nalézt v cytoplasmě granulocytů (292). V přítomnosti kalcia tvoří S100A12 homodimery. S100A12 hraje roli v zánětlivé ose, zahrnující receptor RAGE, který je exprimován na endotelu a buňkách imunitního systému (293). Vazba S100A12 na RAGE vede k aktivaci intracelulárních signálních mechanismů. Prvotní zánětlivý stimul působí NF- κ B řízenou expresi kalgranulinů na granulocytech. To vede k NF- κ B řízené expresi adhezních molekul (ICAMs, VCAMs) nebo selektinů na cévním endotelu. S100A12 má také přímé chemotaktické účinky na fagocyty (294). Monocyty a granulocyty jsou atrahovány do místa zánětu. S100A12 cestou RAGE up-reguluje expresi prozánětlivých cytokinů (TNF α a IL-1 β) makrofágy. Periferní mononukleáry po expozici S100A12 uvolňují IL-2. Kalgranuliny se tak podílí na začarovaném zánětlivém kruhu, který způsobuje řadu chorob (295).

Kalgranulinem vyvolaný zánět urychluje u myši s CKD vývoj HLK a kalcifikací chlopní (296). Zánětlivé stimuly (IL-6, TNF α , LPS) zvyšují expresi FGF23 v srdečních fibroblastech (297). Exprese S100A12 je zvýšena v leukocytech nemocných s KV chorobou a CKD 4-5. (298). Hladiny S100A12, věk ≥ 65 let, snížený s-albumin a anamnéza KV choroby jsou nezávislými prediktory mortality (298). Hladina S100A12 koreluje s hladinou hs-CRP (299) a s výskytem KV onemocnění u HD (298). Studie ukazují, že S100 proteiny spouštějí buněčnou proliferaci a sekreci cytokinů, čímž aktivují imunitní buňky klíčové v patogenezi zánětu a aterosklerózy (300) a mohou být prediktorem mortality u CKD nemocných (301, 298). U nemocných s CKD 3-4 a HD nemocných, sledovaných po dobu 23 měsíců, byly hladiny sRAGE i EN-RAGE zvýšeny oproti zdravým kontrolám. U HD skupiny hladiny S100A12 korelovaly s hsCRP a byly vyšší u nemocných s KV anamnézou. Hladina S100A12 nezávisle korelovala s rizikem mortality. Naopak hladina sRAGE nekorelovala s hsCRP, KV anamnézou ani mortalitou (276).

Obrana proti karbonylovému stresu zahrnuje antioxidanty, např. přirozené polyfenoly. Tyto látky mohou snižovat incidenci metabolických chorob, neurodegenerativních chorob, některých druhů rakoviny a mohou také zpomalovat stárnutí. Karbonylové skupiny mohou být redukovány různými NADPH-dependentními enzymy z několika oxidoredukčních rodin. Tyto enzymy jsou protektivní vůči xenobiotickým karbonylům a chinonům, neboť metabolická redukce vede k méně toxickým produktům, jež mohou být metabolizovány nebo vyloučeny (302). Výzkumy

naznačují, že stupeň adaptativní odpovědi buněk na reduktanty a oxidanty určuje jejich přežití. To je spojeno s křehkou rovnováhou buněčné redox kapacity a signalizace a možná zde leží odpověď na otázku, proč mohou některé antioxidanty způsobit více škody než užitku. Dieta bohatá na polyfenoly a jiné antioxidanty může mít určitý vliv na zpomalení věkem podmíněných poruch. Deficity antioxidantních vitamínů a nedostatečná enzymatická antioxidantní ochrana jsou naopak charakteristické pro mnoho věkem podmíněných chorob (303).

Tabulka 2– Biologické účinky AGEs/ALEs a RCOs (279)

AGEs/ALEs →	Chemotaxe monocytů Sekrece zánětlivých cytokinů z makrofágů Sekrece kolagenázy ze synoviálních buněk Osteoklasty indukovaná kostní resorpce Proliferace cévních svalových buněk Agregace destiček Intracelulární signalizace
RCOs→	Strukturální alterace tkáňových proteinů Rezistence na kalcitriol Produkce VEGF u endoteliálních a mesoteliálních buněk Buněčná apoptóza Intracelulární signalizace

1.7.4. Malnutrice – zánět – ateroskleróza (malnutrition-inflammation-atherosclerosis; MIA syndrome)

Hypoalbuminémie je běžným nálezem u CKD a je spojena s protein-energetickou malnutricí, zánětem a špatnou prognózou HD nemocných. (304). Protein-energetická malnutrice (PEM), také nazývaná PEW (protein-energy wasting), je stavem, kdy jsou v těle snižené zásoby proteinů a /nebo deplece tuků. Jde o stav snížené funkční kapacity, způsobený hlavně sníženým nutričním příjmem, který neodpovídá nárokům organismu (305). U dialyzovaných je PEM častá (18-75%) (305) a je rizikovým faktorem snížené kvality života a vysoké morbidity a mortality (306). Možné příčiny PEM u ESRD jsou následující: 1. Neadekvátní příjem, anorexie (uremická toxicita, zánět, komorbidita, psychický stav), 2. Dietní restrikce (omezení draslíku, fosfátů, neadekvátní nutriční poradenství, sociální důvody). 3. Ztráty během dialýzy (do dialyzátu), 4. Hyperkatabolismus (komorbidita, KV choroby, diabetes mellitus, infekce). 5. Endokrinní poruchy v urémii (rezistence na inzulín, na růstové hormony, hyperparatyreóza). 6. Acidóza . PEM začíná již při poklesu GFR pod 55 ml/min (306) a vyvíjí se hypoalbuminémie, hypotransferémie, hypocholesterolémie, což bylo ukázáno ve studii MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) (308). Hodnocení PEM zahrnuje: hodnocení dietního příjmu, laboratorní parametry, tělesné složení, antropometrii.

PEM a zánět se u HD nemocných většinou se vyskytují současně PEM je u této populace považována za důsledek chronického zánětu. Prozánětlivé cytokiny, jako je TNF- α podporují katabolismus proteinů a anorexii (309). Nízká chuť k jídlu souvisí s hladinami zánětlivých markerů u dialyzovaných nemocných, je suprimována tvorba albuminu a cholesterolu a stoupá hladina CRP (310). Používá se termín „MIA“ a „MICS“ (Malnutrition-Inflammation-Atherosclerosis resp. Malnutrition-Inflammation Complex Syndrome). Pravděpodobnými příčinami jsou: komorbidita, oxidační a karbonylový stres, ztráty nutrientů během dialýzy, anorexie, uremické toxiny, snížená clearance zánětlivých cytokinů, volumové přetížení a jiné. MICS je hlavní příčinou rezistence na erythropoietin, zrychlené aterosklerózy, snížené kvality života a vysoké mortality u HD nemocných. MICS vede k poklesu BMI, cholesterolu, s-kreatininu a homocysteinu. Léčba MICS je zatím nedostatečně účinná, efektivní terapie by přitom mohla zlepšit současnou špatnou prognózu ESRD nemocných.

U dialyzovaných nemocných se uplatňuje tzv. “reverzní epidemiologie” KV rizika, kdy některé konvenční rizikové faktory: obezita, hypercholesterolemie, zvýšený s-kreatinin a vyšší TK jsou u této populace protektivní a „paradoxně“ jsou spojeny s lepším přežitím. Etiologie této inverzní asociace není jasná. Uvažuje se o časové diskrepanci mezi různými kompetitivními rizikovými faktory. Například malnutrice u dialyzovaných může mít v krátkém časovém úseku silný negativní vliv na prognózu, takže se neuplatní dlouhodobý negativní vliv obezity. Je možné, že MICS je hlavní příčinou reverzní epidemiologie u HD nemocných. Je tedy třeba stanovit nová doporučení pro cílové hranice BMI, cholesterolu a krevního tlaku u HD populace. MICS je zřejmě silnějším rizikovým faktorem mortality než jsou tradiční KV rizikové faktory (311).

1.7.5. Placentární růstový faktor (PlGF)

PlGF je členem rodiny pro-proliferativních endoteliálních cévních růstových faktorů a je proaterogenním cytokinem, jenž stimuluje angiogenezu v ischemických tkáních, je silným chemoatraktantem monocytů a reguluje růst cévního endotelu. Jde o 50-kDa heterodimer o 149 aminokyselinách, složením se podobá VEGF (vascular endothelial growth factor). PlGF je secernován jako homodimer, ale může tvořit heterodimery s VEGF (312). Součástí PlGF je signální sekvence o 21 AMK s centrální doménou obsahující cysteinové rezidua (313). PlGF i VEGF se vážou na stejný receptor VEGF R1. VEGF a PlGF mají zřejmě odlišný účinek na aktivitu VEGF R1, a tak ovlivňují expresi odlišných genů (314). PlGF lze nalézt nejméně ve 4 různých formách: PlGF-1, PlGF-2, PlGF-3 a PlGF-4 (315). Rozdíly mezi nimi zahrnují například inzerci heparin-vázající domény u PlGF-2 a

PlGF-4, což může vést k vyšší vazbě na buněčnou membránu nebo různou afinitu k PlGF receptorům (316).

PlGF byl poprvé identifikován v lidské placentě a tam je také za normálních podmínek nejvíce exprimován (315). Zvýšená exprese PlGF v placentě může chránit trofoblast před apoptózou. U žen s preeklampií jsou hladiny PlGF významně vyšší. Další tkáně exprimující PlGF jsou: srdce, štítná žláza, plíce, kostní dřeň a kosterní sval (317).

Biologické funkce PlGF jsou intenzivně studovány. PlGF působí dvěma mechanismy, buď přímo atrahuje buňky exprimující VEGFR-1, nebo indukuje expresi MMP-9 v buňkách stromatu kostní dřeně. MMP-9 štěpí buněčný povrch solubilního Kit ligandu, který pak přispívá k mobilizaci hematopoietických kmenových buněk. Tyto buňky a endoteliální progenitorové buňky vstupují do cirkulace a stimulují angiogenezi stejně jako obnovu hematopoézy po myelosupresi. Tyto procesy podporuje PlGF. Naopak, inhibice VEGFR-1– signalizace pomocí protilátek inhibuje mobilizaci kmenových buněk a invazi zánětlivých buněk do tkání (434).

Mechanismus působení PlGF na endotel cév není jasný. Mohlo by jít o přímou aktivaci VEGF R1 cestou PlGF (318). PlGF možná synergicky podporuje VEGF indukovanou angiogenezi a cévní permeabilitu (319). PlGF hraje roli v iniciaci zánětlivého procesu. PlGF stimuluje aktivaci a chemotaxi monocytů a touto cestou podporuje arteriogenezi in vivo (320). PlGF také aktivuje kmenové buňky z klidového do proliferujícího stádia a stimuluje tak hematopoézu v kostní dřeni (316). Up-regulace PlGF byla ukázána v AS lézích (321). PlGF stimuluje růst cévních svalových buněk, účast makrofágů v AS lézích, zvyšuje produkci TNF- α a MCP-1 makrofágy a stimuluje angiogenezi (321). Zvýšené hladiny PlGF byly popsány u různých patologických stavů, jakou jsou malignity (322), hojení ran a fraktur (323) a srpkovitá anémie (324).

PlGF cestou parakrinních faktorů (např. IL-6) indukuje kapilární růst a proliferaci fibroblastů, což sekundárně podporuje kardiální adaptaci a hypertrofii. (327). PlGF je mediátorem adaptační kardiální hypertrofie a angiogeneze, díky své schopnosti koordinovat intercelulární komunikaci mezi různými typy srdečních buněk. V odpověď na poškození dochází v myokardu ke koordinované neoangiogenezi a fibrotické reakci, jež podporuje přežití kardiomyocytů a ventrikulární remodelaci. Parakrinní spolupráce mezi kardiomyocyty a nonmyocyty v srdci je klíčová pro adaptaci na stres, pro rozsah hypertrofie a angiogeneze. Ve zvířecím modelu je PlGF asociován s hypertrofií LK (326), ale málo je známo o vztahu PlGF k HLK u lidí. Angiogeneze u dospělého je přísně regulovaný proces, ale může být patologická během různých chorob jako je malignita, ateroskleróza, artritida, diabetická retinopatie a makulární degenerace. Angiogenezi modulují zvláště faktory z rodiny VEGF a receptory VEGFR-1, VEGFR-2 (328).

PIGF neovlivňuje cévy ve zdravých orgánech. Ve zvířecím modelu chronické ischemie myokardu zvýšily infuze rhPIGF regionální MBF (myocardial blood flow) a systolické ztlustění stěny v ischemické oblasti, došlo ke zvýšení neovaskularizace, zvýšené utilizaci glykogenu a snížení oxidačního stresu a apoptózy v ischemické zóně. PIGF může představovat léčebnou strategii ke zlepšení energetiky a perfuze myokardu u chronické ischemie myokardu. (329)

Srdeční selhání bývá terminálním stádiem různých kardiomyopatií, předchází ho časná adaptační hypertrofická odpověď, kdy dochází k růstu kardiomyocytů, k angiogenezi a zánětu, na nichž se podílí řada růstových faktorů a cytokinů. U myši bez exprese PIGF po konstrikci aorty došlo ke snížení srdeční remodelace. Na molekulární úrovni to bylo způsobeno hlavně selháním zánětlivé odpovědi díky porušené aktivitě TNF- α -konvertujícího enzymu (TACE), rostla hladina tkáňového inhibitoru metaloproteinázy-3 (TIMP-3, přirozený TACE inhibitor). Pokud byla redukována hladina TIMP-3, došlo ke kompletní reparaci časně dilatační kardiomyopatie. PIGF reguluje zánět v srdci cestou TIMP-3/TACE a následnou aktivaci TNF- α (330).

PIGF over-exprimující (transgenní) myši vykazovaly zvýšení kardiální hypertrofické odpovědi, zvýšení kapilární denzity a vyšší obsah fibroblastů v srdci. Naopak, PIGF(-/-) myši uhynuly na srdeční selhání do 1 týdne od tlakové zátěže, nedošlo u nich k upregulaci angiogeneze a aktivita fibroblastů v srdci byla nižší. Inhibice PIGF pomocí blokády jeho receptoru ve zvířecím modelu potlačila růst AS plátů i jeho vulnerabilitu, cestou inhibice infiltrace zánětlivých buněk (321). PIGF by mohl být nezávislým biomarkerem cévního zánětu, disrupce plátu, ischemie a trombózy. PIGF může mít vliv na KV prognózu nemocných s CKD (325).

1.7.6. Matrix metaloproteinázy, PAPP-A

Jedná se o Zn-dependentní, prozánětlivé a proteolytické enzymy. Lze je identifikovat m.j. v plazmě a v AS plátech bohatých na lipidy. Mají schopnost degradovat extracelulární matrix, a tak přispívají k nestabilitě plátu, účinkují v progresi aterosklerózy, angiogenezi a remodelaci levé komory (331). Jejich zástupci jsou např. PAPP-A, MMP-2 a MMP-9.

Pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) je glykoprotein o MW asi 200 kDa. PAPP-A obsahuje 1547 aminokyselin, 82 cysteinových reziduí. PAPP-A se vyskytuje jednak jako homodimer o 400 kDa (který je proteolyticky aktivní) a také jako inaktivní heterotetramerický komplex o 500 kDa (332). MW komplexu PAPP-A/proMBP je kolem 480000. Jedná se o tetramer 2*PAPP-A + 2*proMBP (pro-forma hlavního bazického proteinu eozinofilů, major basic protein). PAPP-A se může rozštěpit na fragmenty o 150 kDa a 50kDa (333). ProMBP (pro-forma Major Basic Protein) má cDNA v eosinofilech, placentárních buňkách. ProMBP má MW 39000 a tvoří

komplexy s PAPP-A a s angiotenzinogenem. Význam těchto komplexů je neznámý. Komplex PAPP-A/proMBP je měřitelný u netěhotných žen i mužů. Problémem měření je použití protilátek. V případě, že se používají polyklonální protilátky, jsou ve skutečnosti také proti proMBP, který je v nadbytku a výsledek charakterizuje přítomnost jiných komplexů proMBP, které neobsahují PAPP-A. Polyklonální protilátky rovněž reagují s haptoglobinem. Existují postupy pro stanovení PAPP-A pomocí monoklonálních protilátek, které odstraňují nevýhody polyklonálních protilátek (334).

PAPP-A je syntetizovaný typicky v syncytiotrofoblastu, užívá se v těhotenství ke screeningu Downova syndromu (335), je dále produkován fibroblasty, osteoblasty, endoteliálními a cévními svalovými buňkami, buňkami endometria, tlustého střeva, ledvin, žlutého tělíska, testes. Přítomnost PAPP-A byla popsána v placentě, v ledvině, střevě, osteoblastech a myocytech cévní stěny (336). PAPP-A je Zn-vázající matrix-metaloproteináza. Enzymatická aktivita PAPP-A působí na IGF (insulin-like growth factor) vázající proteiny 2, 4 a 5 a výsledkem je volný IGF (337). PAPP-A se v aktivní homodimerické formě nachází v erodovaném cévním plátu, ale je naopak minimálně exprimován ve stabilním plátu (338). In vitro studie ukazují, že IGF může indukovat aktivaci makrofágů, chemotaxi, vychytávání LDL cholesterolu makrofágy a výdej prozánětlivých a proaterogenních cytokinů (338). PAPP-A spouští lokální proliferační odpověď cestou IGF.

Hladina PAPP-A stoupá v pozdních stádiích CKD (339) a koreluje s hladinou iPTH a ALP, což ukazuje na možnou souvislost s renální osteodystrofií (340). U pacientů s anginou pectoris a normální eGFR byla hladina PAPP-A vyšší u mužů a hypertenzních nemocných, korelovala s věkem a s nálezem „multi-vessel disease“ na koronarografii (Cosin-Sales). Přitom nebyla nalezena významná korelace mezi hladinou PAPP-A a cholesterolu, CRP nebo kardioenzymy (342). Hladiny PAPP-A jsou spojeny s negativní prognózou CKD nemocných (339).

Matrix- metaloproteinázy (MMPs) jsou Zn-dependentní endopeptidázy. Patří do metzincinové superrodiny. Aktivita MMPs je za normální podmínek velmi nízká, ale jejich exprese je ovlivněna zánětlivými cytokiny, růstovými faktory, hormony a buněčnými interakcemi (343). Exprese a aktivita MMPs je regulována hemodynamickými, proinflamačními a oxidačními vlivy, m.j. dvěma typy endogenních inhibitorů: α 2-makroglobulin a TIMPs. Rovnováha mezi MMPs a TIMPs je klíčová pro remodelaci extracelulární matrix (ECM). MMPs mají společnou doménovou strukturu a skládají se z propeptidu o 80 aminokyselinách, katalytické domény o 170 AMK, flexibilního peptidu různé délky („hinge region“) a hemopexinové domény o 200 AMK (344) .

Hlavní funkcí MMPs je degradace ECM. MMPs také mohou mít vliv na buněčnou migraci, diferenciaci, růst, zánětlivé procesy, neovaskularizaci, apoptózu a další. MMPs jsou syntetizovány

jako pre-proenzymy. MMPs jsou produkovány v řadě buněk, m.j. také v endoteliálních buňkách, v buňkách hladké svaloviny cév a ve fibroblastech. MMPs účinkují v mnoha biologických i patologických procesech. MMPs jsou schopny degradovat složky ECM (laminin, elastin, kolagen) v reakci na ischemicko-reperfuční poškození, a tak způsobovat remodelaci myokardu. Jsou mediátory angiogeneze, způsobují rupturu elastických vláken myokardu a cévní stěny a fibrotickou přestavbu (345), s rozvojem diastolického srdečního selhání. MMP-2 a 9 hrají roli ve vývoji srdečního selhání a remodelace ECM (346). Účastní se v procesu tvorby AS plátu i jeho ruptury. MMPs působí mobilizaci růstových faktorů z ECM, a tak ovlivňují proliferaci, migraci a přežití VSMC.

Matrix-metaloproteinázy 2 a 9 bývají označovány jako gelatinázy. Jedná se o proteolytické enzymy o molekulové hmotnosti 60 kDa resp. 85 kDa. Gelatinázy mají tři sekvence fibronectin-vázající domény, které jim umožňují vazbu na gelatin, kolagen a laminin. Gelatinázy štěpí kolagen IV, V a XI, laminin a další proteiny. MMP-2 (ale ne MMP-9) štěpí kolagen I, II a III (347). Matrix-metaloproteináza-2 (MMP-2) je také označována jako gelatináza A. MMP-2 štěpí ECM proteiny v ledvinách a cévách, včetně fibronektinu, lamininu a kolagenů (349). Různé formy glomerulárního onemocnění jsou charakterizovány hlubokou nerovnováhou mezi syntézou a degradací matrix (349). MMP-2 indukuje tkáňovou remodelaci glomerulů, tubulů a krevních cév, a tak se podílí na progresi CKD a KV onemocnění (350, 351). Plazmatické hladiny MMP-2 nezávisle korelují se s-kreatininem, s proteinurií, IMT (intima media thickness) a výskytem AS plátů u CKD (352). Sapienza et al. u nemocných s nestabilním AS plátem popsali zvýšenou produkci MMP-2 v návaznosti na zvýšený basický FGF (353) MMP-2 vede k narušení tubulární bazální membrány s rozvojem intersticiální fibrozy a glomerulosklerózy (352). MMP-2 je možným nadějným biomarkerem u nemocných s CKD, detailní mechanismus jeho působení u CKD však není dostatečně objasněn.

Matrix-metaloproteináza-9 (MMP-9) je také známá jako gelatináza B. MMP-9 má nejvyšší specificitu pro kolagen IV a V (349). Aktivace proMMP-9 může nastat vlivem expozice NO nebo vlivem proteolytické aktivace. MMP-9 může interagovat s plasminogenem a generovat angiostatin, zvyšovat jeho afinitu pro kolagen, interagovat s adhezní molekulou 1 a působit protizánětlivě cestou redukce IL-2 odpovědi (343). Zvýšené hladiny MMP-9 se pojí se zánětem v AS plátu. Inhibitory MMP-9 (TIMPs) regulují účinky MMP-9 a ovlivňují tak zánět a angiogenezi (343). V experimentu byly myši bez exprese MMP-2 a 9 rezistentní k zátěži CaCl_2 a nedošlo u nich k degradaci a kalcifikaci elastinu aorty (348). MMP-9 může být v budoucnu užitečným biomarkerem renálního a KV poškození.

Inhibitory MMPs jsou předmětem výzkumu. TIMPs, batimastat, marimastat, GM6001 zřejmě působí cestou svých Zn-chelačních schopností. Pacienti po karotické endarterektomii léčení statiny měli nižší expresi MMP-9 (354). Také polyfenoly červeného vína inhibují expresi MMP-2 in vitro (355). Zásoby vitamínu D byly nezávislým determinantem hladiny MMP-9 a CRP (inverzně) u pacientů s DM 2. typu a ICHS. Po suplementaci vitamínem D (500 IU/den) hladiny MMP-a 9 a TIMP-1 a CRP poklesly (356). Mezi syntetické inhibitory MMPs patří doxycyklin, který v experimentu vede k poklesu akumulace kalcia a fosforu a nižší hladině MMP 2 a 9 v aortě.

MMPs zřejmě hrají důležitou roli v patologické glomerulární, tubulointersticiální i cévní remodelaci a jsou tak asociovány s mnoha renálními chorobami a KV rizikem.

1.7.7. Natriuretické peptidy a srdeční troponiny

Srdeční troponiny jsou markery ischemického poškození myokardu, zatímco BNP je typický pro srdeční selhání a myeloperoxidáza je známkou oxidačního a zánětlivého poškození (357). K sekreci ANP a BNP kardiomyocyty dochází při tlakovém a objemovém přetížení srdečních síní nebo komor. Peptidy se dostávají do krevního oběhu a váží se na specifické receptory (NPR-A, NPR-B, NPR-C) na povrchu cílových buněk. Natriuretický peptid A (ANP, atriální natriuretický peptid) je secernován kardiomyocyty srdečních síní ve formě prohormonu (pro-ANP), který je tvořen 126 aminokyselinami a je štěpen na 2 fragmenty – biologicky aktivní ANP (28 aminokyselin) a biologicky inaktivní N-terminální fragment (N-BNP). Natriuretický peptid B (BNP, mozkový natriuretický peptid) je secernován především kardiomyocyty srdečních komor ve formě prohormonu (pro-BNP, 108 aminokyselin) a štěpen na 2 fragmenty – biologicky aktivní BNP a biologicky inaktivní N-terminální fragment (NT-proBNP). Natriuretický peptid C (CNP) je secernován cévním endotelem v reakci na endoteliální stres.

Hladiny BNP a NT-proBNP pomáhají v diagnóze srdečního selhání a jsou prediktory KV příhod a mortality. End-diastolické napětí kardiomyocytů vede k produkci BNP, s vasodilatačními a natriuretickými účinky. U srdečního selhání je rezistence na působení BNP a deficit aktivní formy BNP. BNP se váže na specifický receptor, který produkuje cyklický guanosin monofosfát (cGMP), jenž zprostředkuje biologické účinky BNP. Diagnostické testy zatím nedokážou jasně rozlišit mezi aktivními a inaktivními formami cirkulujícího BNP, takže je možné, že jeho hormonální aktivita je nízká ve srovnání s plazmatickou hladinou. Nicméně byla prokázána asociace mezi zvýšeným BNP a progresí nediabetické CKD do ESRD. Nemocní s CKD mají vyšší hladiny BNP i NT-proBNP, a to i bez klinických známek srdečního selhání. Vyšší hladiny NP jsou možná dány redukcí renální clearance, ale roli hraje i zvýšené napětí myokardu díky hypertenzi, HLK, subklinické ischemii a

srdeční fibróze (358). Nemocní s eGFR ≤ 60 mL/min mají 4x vyšší plazmatický BNP i NT-proBNP oproti nemocným s GFR >60 mL/min. Na základě ROC křivek byla stanovena na věku nezávislá cut-off hodnota NT-proBNP 1200 pg/mL pro nemocné s eGFR <60 mL/min (senzitivita 89%, specificita 72% pro diagnózu srdečního selhání) (361). Kombinace hladiny NTpro BNP a eGFR je vysoce prognostická pro srdeční selhání. BNP, které je jen mírně ovlivněno renální funkcí je zřejmě vhodnější než NT-proBNP v detekci kardiální dysfunkce u CKD.

Troponin T (TnT) a troponin I (TnI) se vyskytují v kosterním svalstvu a myokardu. Kardiální izoformy (cTnT a cTnI) mají jedinečné aminokyselinové složení a jsou proto pro myokard specifické, jsou obsaženy v kontraktilním aparátu a uvolňovány v důsledku proteolytické degradace. Troponiny korelují se závažností ICHS postižení, i v nepřítomnosti typických klinických známek (359). Asociace zvýšených troponinů se špatnou prognózou CKD nemocných byla prokázána, ale specificita a senzitivita troponinů v diagnostice akutní koronární příhody u nemocných s CKD je otazná. Mírná elevace troponinů je běžná u klinicky stabilní CKD a může být vysvětlena strukturální alterací myokardu (360). Až 73% HD nemocných má zvýšené cTnT (361).

1.7.8. Anémie

Anémie, tedy hladina hemoglobinu <120 g/l u žen a <135 g/l u mužů, je u CKD velmi častá a může mít vážné klinické důsledky, jako je: zvýšení srdečního výdeje, HLK, angina pectoris, městnavé srdeční selhání a rychlejší progresse CKD. Porozumět patofyziologii anémie u CKD je klíčové pro optimální léčbu a event. nalezení příčiny rezistence na erytropoetin (ESA) (362). Normální metabolismus Fe může být u CKD nemocných narušen vinou infekce, zánětu nebo oxidačního stresu. Suplementace Fe u CKD je nezbytná, ale podávání železa může zvyšovat oxidační stres (363).

Hladina hemoglobinu (Hgb) predikuje stupeň HLK i systolickou funkci u obecné populace i u CKD nemocných. (364) . Anémie vede ke kompenzatornímu vzestupu srdečního výdeje a následně k hypertrofii a dilataci LK, v kontextu dalších rizikových faktorů a metabolických abnormalit u CKD . Několik studií u CKD 4-5 ukázalo redukci LVMI díky parciální korekci závažné anémie pomocí erytropoetinu (365), ale jiné studie toto nepotvrdily (366). Velká studie CREATE srovnávala efekt kompletní korekce anémie (cílový Hgb 130-150 g/l) a parciální korekce (cílový Hgb 105-115 g/l) u nemocných s CKD 3-4 (368). Tato i další velké studie ukázaly zhoršení KV prognózy při kompletní korekci Hgb (369) . Mechanismy jsou nejasné, ale zvýšení krevního volumu, krevní viskozity a vyššího TK může zhoršovat kardiální přetížení (368).

1.7.9. Vitamin K

Matrix gla protein (MGP), který je syntetizován VSMC v médiu tepen, je vitamin K-dependentním inhibítor vzniků krystalů kalcia a fosfátů v cévní stěně. Deficit vitaminu K snižuje aktivaci MGP a ten ztrácí svůj inhibiční účinek na progresi VC. Nedávná studie ukázala, že většina HD nemocných má deficit vitaminu K, také díky nízkému příjmu potravy (omezení zelené zeleniny). Deficit vitaminu K koreluje s frakturami a VC u obecné populace. Suplementace vitaminem K by mohla pomoci v prevenci a léčbě cévních kalcifikací (370).

1.7.10. Opomíjená kardiovaskulární (KV) rizika

Spánková apnoe je u dialyzovaných nemocných asi 10x častější než u běžné populace. Noční pokles pO_2 je u HD nemocných prediktorem úmrtí. Příčinou je nejspíše centrální dysbalance dechové kontroly a okluze dýchacích cest. Adaptace na chronickou metabolickou acidózu vede k hypokapnii, jež je příčinou periodického dýchání. Periodické dýchání vede k okluzi horních dýchacích cest, jejichž svalovina má během apnoe nižší přísun kyslíku. HD nemocní mohou mít edém dýchacích cest z důvodu hyperhydratace a redukováného svalového tonu při urémii a neuropatii. Každodenní domácí noční dialýzy redukovaly výskyt hypokapnie a riziko spánkové apnoe (371, 372). Intervenční studie u běžné populace ukázaly, že léčba spánkové apnoe zlepšila přežití.

Deprese: Depresi trpí až 30% HD nemocných a mortalita stoupá s dobou trvání deprese, u běžné populace s KV onemocněním je deprese nezávislým prediktorem úmrtí (373), je ale nejasné, zda je tato asociace kauzální. Kardiologická literatura popisuje několik patogenetických mechanismů: autonomní dysbalance, hyperkortikalismus, insulinová rezistence, mikrozánět. Je otázkou, zda mikrozánět způsobuje depresi a zda intervence zmírňující zánět mohou redukovat depresi u CKD nemocných (374).

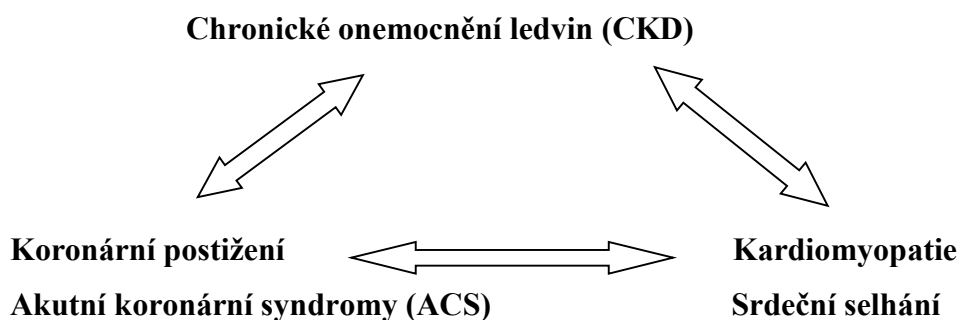
Dialyzovaní nemocní mají často poruchy spánku a poruchy rytmu den-noc. Tyto poruchy jsou asociovány s vyšším BMI ($>30 \text{ kg/m}^2$), přítomností ICHS, DM, plicních chorob, deprese, pruritu, s vyšší fosfatémií a jsou častější u kuřáků. Naopak nebyla zjištěna souvislost s délkou dialyzační procedury. Porucha spánku je silným prediktorem mortality (375).

1.8. Biomarkery KV rizika u CKD – shrnutí

U KRS II. A IV. je prognóza asociována s biomarkery jako jsou troponiny, asymetrický dimethylarginin, homocystein, natriuretický peptid, CRP a ischemií modifikovaný albumin (376). CRP a ischemií modifikovaný albumin inhibují diferenciaci, funkci a přežití endoteliálních buněk (377). Tyto buňky jsou klíčové v angiogenezi a cévní odpovědi na ischemii, takže jsou pojítkem mezi chronickým zánětem a aterosklerózou (377). Ve vývoji kardiomyopatie a chronického srdečního selhání hrají ústřední roli prozánětlivé cytokiny, zvláště TNF-alpha, IL-1 a IL-6, které působí poškození kardiomyocytů (378). Vzhledem k jejich nespecifickému charakteru a obtížnému měření, nejsou užívány v klinické praxi.

Mnoho pacientů trpí zároveň renální nedostatečností, koronárním postižením a srdečním selháním (Obrázek 5). Hladiny biomarkerů se mohou měnit v závislosti na orgánovém poškození, i v nepřítomnosti typických klinických známek a mohou umožnit časnou intervenci. Biomarkery KV rizika by měly (i) časně identifikovat KRS, (ii) stratifikovat riziko, (iii) být cílem léčby, (iv) pomoci monitorovat efekt léčby. Ideální biomarker by měl do klinické praxe dodat prognostickou informaci, k již existujícím konvenčním (Framingham) rizikovým faktorům. Identifikace nových biomarkerů by také mohla odhalit nové patofyziologické cesty (379).

Obrázek 5: Kardiorenální syndrom typu IV.



CKD nemocní většinou umírají z KV příčin. CKD je silným prediktorem akutních koronárních syndromů (ACS) a chronického srdečního selhání. Velká část kardiálních pacientů (trpících ACS nebo srdečním selháním) má CKD.

2. CÍLE STUDIE

Hladiny FGF-23, MMPs i PIGF jsou u nemocných s CKD zvýšené. Hladina FGF-23 koreluje s výskytem cévních kalcifikací v tepnách dialyzovaných pacientů a je asociována se špatnou

prognózou CKD nemocných zahajujících dialyzační léčeni . Zvýšená hladina FGF-23 pravděpodobně souvisí s výskytem srdečně-cévních onemocnění u této populace. MMPs patrně podporují vazivovou přeměnu myokardu a cévní stěny, účastní se procesu ruptury AS plátu a podporují vývoj kalcifikací tepen. Placentární růstový faktor (PIGF) je marker kardiovaskulárního (KV) rizika, který je ve zvířecím modelu spojován s hypertrofií levé srdeční komory (HLK). V současnosti nejsou k dispozici data, která by potvrdovala možnou souvislost PIGF s vývojem HLK a/nebo diastolické dysfunkce u nemocných s chronickým onemocněním ledvin. Také dosud nebyl popsán možný vztah PIGF k ostatním KV rizikovým faktorům u nemocných s CKD. Málo je známo o echokardiografických změnách u pacientů s časnými stádii CKD.

Proto jsme si stanovili tyto cíle:

1. v průřezové studii u nemocných s CKD 1-5, dosud nezávislých na dialýze
 - a) zjistit, zda existuje vzájemná souvislost mezi plazmatickou hladinou FGF23, parametry kalcio-fosfátového metabolismu a matrix-metaloproteinázami
 - b) ozřejmit, zda existuje souvislost výše zmíněných biomarkerů (FGF23, parametry Ca-P metabolismu a MMPs) s anamnézou kardiovaskulárních (KV) komplikací
2. v prospektivní a observační studii u nemocných s CKD stádii 2-4
 - a) posoudit, zda plazmatická hladina placentárního růstového faktoru (PIGF) predikuje zvýšení hmotnostního indexu levé srdeční komory (LVMI) u nemocných s mírnou a středně těžkou renální insuficiencí (CKD)
 - b) zjistit, zda existuje korelace hladin PIGF a dalších proaterogenních a KV rizikových faktorů s echokardiografickými parametry CKD nemocných

3. MATERIÁL A METODY

3.1. SUBJEKTY

Studie byla schválena 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 nemocných s CKD 1-5. Průřezová studie.

Do studie jsme zařadili 80 pacientů z nefrologických ambulancí VFN, v různých stádiích CKD 1-5. Kontrolní skupinu tvořilo 44 věkově odpovídajících zdravých osob. Všichni podepsali informovaný souhlas a byly jim odebrány laboratorní vzorky, v souladu s etickými zásadami. Klinické, demografické a biochemické charakteristiky našeho souboru jsou prezentovány v Tabulce 4.

Etiologie CKD byla následující: ANCA asociované vaskulitidy (21%), hypertenzní nefropatie (16%), lupusová nefritida (14%), IgA glomerulonefritida (14%), diabetická nefropatie (10%), membranózní nefropatie (9%), fokálně segmentální glomeruloskleróza nebo onemocnění minimálních změn (8%), amyloidóza (5%) a jiné (3%). Pacienti byli rozděleni do čtyř CKD podskupin, podle renální funkce (eGFR, MDRD), na základě mezinárodních doporučení K/DOQI : 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). Informace o výskytu KV onemocnění byly získány z lékařských záznamů jednotlivých pacientů a za KV onemocnění byly považovány: ischemická choroba srdeční, ischemická choroba dolních končetin a ischemické onemocnění mozku. 88% pacientů užívalo ACE inhibitory a / nebo AT-1 blokátory, 48% nemocných užívalo kalcium, 23% nemocných užívalo kalcitriol a 45% dostávali léčbu statiny.

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

V období od prosince 2004 do května 2009 jsme na Klinice Nefrologie VFN v Praze postupně vybrali 76 ambulantních pacientů s mírnou až středně těžkou renální insuficiencí (CKD 2–4). Tito nemocní poté byli sledováni po průměrnou dobu 36 ± 10 měsíců. Vybrané laboratorní a echokardiografické parametry těchto subjektů byly sledovány prospektivně. Data byla odebírána u každého pacienta 2–3 krát, v nejkratším intervalu 12 měsíců od jednotlivých měření. Během sledovaného období 8 nemocných zemřelo a 6 nemocných ze studie vystoupilo na základě vlastního rozhodnutí. Finální data byla nakonec zpracována u 62 pacientů, kteří celé sledování dokončili. Funkce ledvin (eGFR) byla vypočítána podle MDRD vzorce. CKD bylo definováno jako pokles eGFR pod 1ml/s/1,73m^2 . Klinické a demografické charakteristiky našeho souboru pacientů jsou prezentovány v Tabulce 8. Etiologie CKD byla následující: ischemická nefropatie (21%), IgA nefritis (15%), chronická pyelonefritis (13%), hypertenzní nefropatie (11%), diabetická nefropatie (10%), ANCA asociovaná vaskulitis (5%), lupusová nefritis (5%) a ostatní příčiny (20%). 92 % nemocných užívalo ACE inhibitory a/nebo AT-1 blokátory, 13% bylo substituováno vápníkem 44% dostávalo léčbu kalcitriolem a 61% léčbu statiny. Anamnéza KV chorob byla převzata z lékařských záznamů jednotlivých nemocných a zahrnovala ischemickou chorobu srdeční, ischemickou chorobu dolních končetin a / nebo cévní mozkovou příhodu. Anamnéza KV chorob byla pozitivní u 31 nemocných (50%). Žádný z pacientů neměl klinické příznaky srdečního selhání (NYHA III. Nebo IV.) ani hemodynamicky významnou chlopenní vadu.

3.2. Biochemická analýza

Venózní krevní vzorky byly odebrány každému pacientovi nalačno, z kubitální žíly, spolu s rutinními odběry pro potřeby ambulantní kontroly. Krevní vzorky byly centrifugovány 10 minut při 1,450 g (4°C). Sérum bylo skladováno při teplotě -80°C až do okamžiku laboratorní analýzy.

3.2.1. Stanovení placentárního růstového faktoru (PIGF) v lidské plasmě

Princip metody

Koncentrace PIGF byla změřena v séru metodou ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). K měření byly využity standardní kity (Quantikine, RD Systems, MN. Minneapolis, MN, USA) dle doporučeného postupu výrobce. Výsledky jsou vyjádřeny v jednotkách pg/ml, detekční limit je méně než 7 pg/ml. Metoda je založena na principu kvantitativní sendvičové techniky. Souprava obsahuje destičku s navázanou monoklonální protilátkou specifickou pro PIGF. Standardy a vzorek jsou pipetovány do jamek mikrotitrační destičky a přítomný PIGF se váže na protilátku navázanou na destičce. Po odstranění nenavázaného materiálu se stanoví množství navázaného PIGF pomocí přidané, s enzymem konjugované další protilátky. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na produkt, který je barevný. Změna zabarvení měřená při 450 nm je tak přímo úměrná množství PIGF v testovaném vzorku.

Pracovní postup

Roztoky

- promývací roztok: 20 ml promývacího roztoku ve 500 ml redestilované vody
 - substrátový roztok: roztoky A+B v poměru 1:1, 200 µl/vzorek
 - konjugát
 - zastavovací roztok
 - nulový standard: 500 ul roztoku RD6-11
 - připravíme sérii standardů s koncentracemi 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml v objemu 500 ul.
1. napipetujeme 100 ul ředícího roztoku RD1-22 do každé jamky
 2. do jamky napipetujeme 100 ul vzorku nebo standardu, zamícháme a inkubujeme při laboratorní teplotě 2 hodiny
 3. každou jamku 4x promyjeme promývacím roztokem
 4. do každé jamky přidáme 200 ul konjugátu, zamícháme a inkubujeme při laboratorní teplotě 2 hodiny

5. každou jamku 4x promyjeme promývacím roztokem a přidáme 200 ul substrátu.
Zamícháme a inkubujeme 30 minut při laboratorní teplotě bez přístupu světla
6. do každé jamky přidáme 50 ul zastavovacího roztoku a jemně zamícháme. Měříme absorbanci při 450 nm
7. koncentraci vzorku odečteme z kalibrační křivky

3.2.2. Stanovení PAPP-A v séru

Princip metody

Sérové koncentrace PAPP-A byly stanoveny pomocí metody TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission – zesílená emise kryptátu rozložená v čase). Využity byly komerční kity KRYPTOR-PAPP-A (Brahms, Německo). Hladina PAPP-A v séru je vyjádřena v jednotkách IU/l, mez detekce je 0,004 IU/l. Konverzní poměr: 1 IU/l = 4500 ng/ml. Principem TRACE metody je přenos neradioaktivní energie z donoru na akceptor, které se vážou na vzorek ve stejnou dobu. Když je vzorek vybuzen laserem dusíku při 337 nm, donor (kryptát – struktura připomínající klec s iontem europia ve středu) emituje fluorescenční signál v milisekundách při 620 nm, zatímco akceptor (chemicky modifikovaný, světlo pohlcující protein z řas XL665) generuje signál v nanosekundovém rozsahu při 665 nm. Když je donor i akceptor navázaný na imunokomplex, při 665 nm dojde k zesílení signálu a prodloužení životnosti signálu akceptoru, který lze měřit po dobu několika mikrosekund. Tento signál s dlouhou životností je úměrný koncentraci měřeného analytu. Nespecifické signály (signály krátkodobého a nenavázaného akceptoru XL665) a středně specifické signály podmíněné přirozenou fluorescencí vzorku jsou eliminovány dočasným zpožděním měření fluorescence. Signál generovaný kryptátem při 620 nm slouží jako interní reference a měří se simultánně se signálem akceptoru o dlouhé životnosti při 665 nm, který je specifickým signálem.

Pracovní postup

1. pomocí soupravy PAPP-A Calibrator provedeme readjustaci kalibrační křivky
2. kontrolní materiál ve zkumavkách s čárovými kódy umístíme do držáku zkumavek, zadáme požadavky pro analýzu, provedeme analýzu a vyhodnotíme naměřená data – když naměřená data odpovídají tolerančnímu rozmezí, přejdeme k měření vzorků
3. do zkumavek napipetujeme 200 ul vzorku, umístíme do držáku zkumavek a vložíme do analyzátoru, po zadání požadavků v pracovním listu přístroje odstartujeme analýzu.
Inkubace trvá 19 minut

3.2.3. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ MMP-2 V SÉRU METODOU ELISA

Princip metody

Koncentrace MMP-2 byla změřena v séru metodou ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). K měření byly využity standardní kity (Quantikine, RD Systems, Minneapolis, MN, USA) dle doporučeného postupu výrobce. Výsledky jsou vyjádřeny v jednotkách ng/ml. Minimální detekční mez MMP-2 je 0,047 ng/mL.

Metoda je založena na principu kvantitativní sendvičové techniky. Souprava obsahuje destičku s navázanou polyklonální protilátkou specifickou pro MMP-2. Standardy a vzorek jsou pipetovány do jamek destičky a přítomný MMP-2 se váže na protilátku navázanou na destičce. Po odstranění nenavázaného materiálu se stanoví množství navázaného MMP-2 pomocí přidané, s enzymem konjugované další protilátky. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na produkt, který je barevný. Změna zbarvení měřená při duální vlnové délce 450/570 nm je tak přímo úměrná množství MMP-2 v testovaném vzorku.

Roztoky a pracovní postup

- promývací roztok: 20 ml promývacího roztoku v 500 ml redestilované vody
 - substrátový roztok: roztoky A+B v poměru 1:1, 200 ul/vzorek
 - konjugát
 - zastavovací roztok
 - MMP-2 standard: 50 ng/ml
 - nulový standard: 200 ul roztoku RD5-32 (0 ng/ml)
 - připravíme sérii standardů s koncentracemi 50 ng/ml, 25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 6,25 ng/mL, 3,13 ng/mL, 0,78 ng/mL v objemu 200 ul.
1. napipetujeme 100 μ L ředícího roztoku RD1-74 do každé jamky
 2. 50 μ L standardu, nulového standardu a sérií ředěných standardů napipetujeme do každé jamky. Sérum vyžaduje 10 násobné ředění (20 μ L vzorku a 180 μ L nulového standardu RD5-32). Následně inkubujeme 2 hodiny při pokojové teplotě na třepačce
 3. každou jamku odsajeme a promyjeme a takto promyjeme jamky celkem 4x 400 ul promývacího roztoku
 4. 200 μ L MMP-2 konjugátu přidáme do každé jamky. Inkubujeme po dobu 2 hodin při pokojové teplotě na třepačce. Opakujeme krok číslo 3
 5. 200 μ L substrátového roztoku přidáme do každé jamky. Destičku bez přístupu světla inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě

6. 50 μL zastavovacího roztoku přidáme do každé jamky. Barva v jamkách se změnila z modré na žlutou
7. Absorbanci měříme do 30 minut pomocí spektrofotometru při duální vlnové délce 450/570 nm

Byl použit spektrofotometr Lab Systems, Multiscan RC, Finland. Koncentraci MMP-2 ve vzorku odečítáme z kalibrační křivky, pomocí softwaru *Genesis*.

3.2.4. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ MMP-9 V SÉRU METODOU ELISA

Princip metody

Koncentrace MMP-9 byla změřena v séru metodou ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). K měření byly využity standardní kity (Quantikine, RD Systems, Minneapolis, MN, USA) dle doporučeného postupu výrobce. Výsledky jsou vyjádřeny v jednotkách ng/ml, minimální detekční mez MMP-2 je 0,156 ng/mL. Metoda je založena na principu kvantitativní sendvičové techniky. Souprava obsahuje destičku s navázanou monoklonální protilátkou specifickou pro MMP-9. Standardy a vzorek jsou pipetovány do jamek destičky a přítomný MMP-9 se váže na protilátku navázanou na destičce. Po odstranění nenavázaného materiálu se stanoví množství navázaného MMP-9 pomocí přidané, s enzymem konjugované další protilátky. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na produkt, který je barevný. Změna zabarvení měřená při duální vlnové délce 450/570 nm je tak přímo úměrná množství MMP-9 v testovaném vzorku.

Roztoky a pracovní postup

- promývací roztok: 20 ml promývacího roztoku v 500 ml redestilované vody
 - substrátový roztok: roztoky A+B v poměru 1:1, 200 μL /vzorek
 - konjugát
 - zastavovací roztok
 - MMP-9 standard: 20 ng/ml
 - nulový standard: 500 μL roztoku RD5-10 (0 ng/ml)
 - připravíme sérii standardů s koncentracemi: 10ng/mL, 5 ng/mL, 2,5 ng/mL, 1,125 ng/mL, 0,625 ng/mL, 0,312 ng/mL.
1. napipetujeme 100 μL ředícího roztoku RD1-34 do každé jamky
 2. 100 μL standardu, nulového standardu a sérií ředěných standardů napipetujeme do každé jamky. Sérum vyžaduje 10 násobné ředění (5 μL vzorku a 450 μL nulového

- standardu RD5-10). Inkubujeme 2 hodiny při pokojové teplotě na třepačce při 450 rpm
3. každou jamku odsajeme a promyjeme a takto promyjeme jamky celkem 4x 400 ul promývacího roztoku
 4. 200 µL MMP-9 konjugátu přidáme do každé jamky. Inkubujeme po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě na shakeru. Opakujeme krok číslo 3
 5. 200 µL substrátového roztoku přidáme do každé jamky. Destičku bez přístupu světla inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě
 6. 50 µL zastavovacího roztoku přidáme do každé jamky. Barva v jamkách se změnila z modré na žlutou
 7. Absorbanci měříme do 30 minut pomocí spektrofotometru při duální vlnové délce 450/570 nm

Koncentraci MMP-9 ve vzorku odečítáme z kalibrační křivky, pomocí softwaru *Genesis*. Byl použit spektrofotometr Lab Systems, Multiscan RC, Finland.

3.2.5. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ S100A12/EN-RAGE V SÉRU METODOU ELISA

Princip metody

Koncentrace S100A12/EN-RAGE byla změřena v plasmě metodou ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). K měření byly využity standardní kity (The CircuLex S100A12/EN-RAGE ELISA Kit firmy CycLex Co., Ltd, Nagano, Japan) dle doporučeného postupu výrobce. Minimální detekční mez je 56 pg/mL.

Metoda je založena na principu kvantitativní sendvičové techniky. Souprava obsahuje destičku s navázanou polyklonální protilátkou specifickou pro S100A12/EN-RAGE. Standardy a vzorek jsou pipetovány do jamek destičky a přítomný S100A12/EN-RAGE se váže na protilátku navázanou na destičce. Po odstranění nenavázaného materiálu se stanoví množství navázaného S100A12/EN-RAGE pomocí přidané, s enzymem konjugované další protilátky. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na produkt, který je barevný. Změna zabarvení měřená při duální vlnové délce 450/570 nm je tak přímo úměrná množství S100A12/EN-RAGE v testovaném vzorku.

Roztoky a pracovní postup

- 10x promývací roztok – 10x 100 mL pufru s obsahem 2% Tween®-20
- 5x ředící roztok – 20 ml 5X roztoku, 5 postupných ředění
- S100A12 Standard – 510 ng rekombinantního S100A12/EN-RAGE

- 20x HRP konjugátu detekční polyklonální protilátky anti-S100A12/EN-RAGE
 - ředící roztok konjugátu - 12 mL
 - substrátový roztok - 20 mL chromogenního substrátu, tetra-methylbenzidinu
 - zastavovací roztok - 20 mL
1. vzorky séra naředíme 1:200 (5 μ L vzorek séra a 995 μ L ředícího roztoku)
 2. 100 μ L standardu S100A12/EN-RAGE a ředěných vzorků napipetujeme do příslušných jamek
 3. destičku inkubujeme při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny na třepačce při 300 rpm
 4. každou jamku promyjeme 5x pomocí promývacího roztoku (350 μ L)
 5. přidáme 100 μ L of HRP konjugované detekční protilátky do každé jamky
 6. destičku inkubujeme po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě na třepačce při 300 rpm
 7. každou jamku promyjeme 4x pomocí promývacího roztoku (350 μ L)
 8. přidáme 100 μ L substrátového roztoku
 9. destičku inkubujeme po dobu 15-20 minut při pokojové teplotě
 10. do každé jamky přidáme 100 μ L zastavovacího roztoku

Koncentraci S100A12/EN-RAGE ve vzorku odečteme z kalibrační křivky, pomocí softwaru *Genesis*. Byl použit spektrofotometr Lab Systems, Multiscan RC, Finland.

3.2.6. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ FGF23 (C-terminálního fragmentu) V SÉRU METODOU ELISA

Princip metody : Tato 2.generace kitu pro stanovení lidského FGF23, C terminálního fragmentu, je založena na sendvičové metodě ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, Immutopics, San Clements, CA, USA). Dvě čištěné polyklonální protilátky jsou schopné detekovat epitopy uvnitř karboxyl-terminální (C-Term) části FGF23. Jedna z protilátek je záchytná a druhá protilátka je konjugována s HRP peroxidázou pro detekci. Tyto protilátky se vážou na intaktní molekulu, ale také na terminální fragment lidského FGF23. Vzorek obsahující lidský FGF23 je inkubován se záchytnou protilátkou a zároveň s HRP konjugovanou protilátkou. FGF23 obsažený ve vzorku je imunologicky vázán pomocí záchytné protilátky a detekční protilátky, takže vytvoří sendvič. Po ukončení inkubace jsou jamky promyty, aby se odstranily všechny nenavázané látky. Enzym navázaný na jamku je inkubován se substrátovým roztokem a poté provedeno kvantitativní měření pomocí spektrofotometru. Enzymatická aktivita protilátkového komplexu navázaného na

jamku je přímo úměrná obsahu FGF23 ve vzorku. Koncentrace FGF23 ve vzorku je odečtena pomocí standardní křivky. Detekční limit je 1,5 RU/mL.

Roztoky a pracovní postup

- biotinylovaná lidská anti-FGF23 protilátka
- HRP konjugovaná lidská anti-FGF23 protilátka
- FGF23 standardy
- FGF23 kontroly I & II
- ELISA promývací koncentrát
- ELISA HRP substrát
- ELISA zastavovací roztok
- FGF23 (C-Term) roztok k ředění vzorků

1. napipetujeme 100 μ L standardu, kontroly nebo vzorků do jamek
2. napipetujeme 50 μ L roztoku s protilátkami, který tvoří 1 díl Biotinylované protilátky a 1 díl HRP protilátky do každé jamky
3. jamky inkubujeme ve tmě při pokojové teplotě po dobu 3 hodin na horizontální třepačce při 180 – 220 RPM
4. odsajeme obsah každé jamky, promyjeme každou jamku 5x, celkem 350 μ L promývacího roztoku do každé jamky a kompletně odsajeme obsah každé jamky
5. napipetujeme 150 μ L HRP substrátu do každé jamky
6. inkubujeme bez přístupu světla za pokojové teploty po dobu 30 minut na horizontálním shakeru při 180 - 220 RPM
7. během 5 minut odečteme absorbanci při 620 nm, proti 0 RU/mL standardu
8. ihned napipetujeme 50 μ L zastavovacího roztoku do každé jamky. Promícháme na horizontální třepačce 1 minutu
9. během 10 minut odečteme absorbanci při 450 nm, proti 150 μ L substrátu a 50 μ L zastavovacího roztoku

3.2.7. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ KALCITRIOLU V SÉRU

Princip metody: Souprava IDS 1,25-dihydroxy Vitamin D RIA je kompletní testovací systém pro purifikaci 1,25-dihydroxy vitaminu D (1,25 D) v lidském séru nebo plazmě pomocí imunoextrakce s následným kvantitativním stanovením pomocí 125 I RIA. Vzorky pacienta jsou delipidovány a 1,25 D je extrahován z potenciálně zkříženě reagujících složek pomocí inkubace po dobu 3 hodin s vysoce specifickou monoklonální anti-1,25 D na pevné fázi. Imunoextrakční gel se

pak promyje a purifikovaný 1,25 D je eluován přímo do skleněných testovacích zkumavek. Rekonstituované eluáty a kalibrátory se přes noc inkubují s vysoce specifickou ovčí anti-1,25 D protilátkou, poté se přidá ^{125}I -1,25 D a inkubace pokračuje ještě po dobu 1 hodiny. Separace vázané od volné formy je dosaženo krátkou inkubací se Sac-Cell® s následnou centrifugací, dekantací a měřením radioaktivity. Navázaná radioaktivita je nepřímo úměrná koncentraci 1,25 D. Detekční limit je 6 pmol/L (2,5 pg/mL)

Roztoky a pracovní postup

- Kalibrátory (CAL 0 – CAL 6): lyofilizovaný BAS-MOPS pufr obsahující 1,25 D a <0,4% azid sodný.
- Ab- první protilátka : ovčí anti 1,25 D v BSA-fosfátovém pufru obsahující 0,09% azid sodný.
- Ag ^{125}I - ^{125}I -1,25-dihydroxy vitamin D: ^{125}I -1,25 D v BSA-fosfátovém pufru obsahující 0,09% azid sodný a stabilizátory. obsah radioaktivity <111 kBq (3 μCi) na lahvičku.
- Sac-Cell®: anti-ovčí IgG navázaný na celulózu suspendovaný v pufru obsahujícím 0,09% azid sodný.
- CTRL 1- CTRL 2 – Kontroly : lyofilizované lidské sérum obsahující 1,25 D a <1% azid sodný.
- SORB- imunokapsle : obsahující ovčí monoklonální protilátku proti 1,25D navázanou na částice v pevné fázi v suspenzi s inhibítozem vazebného proteinu vitaminu D.
- REAG 1 – delipidační činidlo.
- REAG 2 – eluční činidlo
- BUF- Pufr: BSA-MOPS pufr obsahující 0,01% azid sodný.
- WASHBUF – promývací koncentrát : fosfátový tlumivý fyziologický roztok

1. zkumavky označíme SPE (vzorek) nebo CTRL (kontrola) a přidáme 500 μl kontroly nebo vzorku

2. do všech zkumavek přidáme 50 μl delipidačního činidla REAG 1. Promícháme.

3. Centrifugujeme při 2000 g po dobu 30 minut

4. provedeme imunoextrakce

a) označíme imunokapsle SORB, dvě na každý vzorek SPE a kontrolu CTRL

b) pomocí vibračního míchadla imunokapsle SORB promícháme a ponecháme ve vertikální poloze 3-5 minut

c) ke kapslím SORB přidáme v duplikátech po 100 μl delipidovaného vzorku nebo kontroly

d) imunokapsle postavíme na 3-5 minut do vertikálního stojanu pro usazení gelu.

Odlomíme uzávěr dna kapslí, každou kapsli umístíme do zkumavky. Centrifugujeme při 1000 g po dobu 1 minuty

e) ke každé imunokapsli přidáme 500 μ l promývacího roztoku WASHBUF SOLN.

Centrifugujeme při 1000 g po dobu 1 minuty

f) opakujeme krok e)

g) imunokapsle přeneseme do skleněných zkumavek

h) do všech imunokapslí přidáme 150 μ l elučního činidla REAG 2. Centrifugujeme při 1000 g po dobu 1 minuty

i) 2 x opakujeme krok h)

j) zkumavky umístíme do vodní lázně při 30 °C. Eluáty odpaříme pomocí jemného průtoku dusíku (asi 30 minut)

k) do každé zkumavky přidáme 100 μ l pufru BUF

5. do označených zkumavek přidáme 100 μ l každého kalibrátoru CAL. Do NSB zkumavek přidáme 300 μ l pufru BUF

6. připravíme zkumavky se vzorkovým extraktem

7. do všech zkumavek kromě NSB přidáme 200 μ l první protilátky Ab

8. pomocí vibračního míchadla jemně promícháme bez napěnění a inkubujeme přes noc (16-18 hod.) při teplotě 2-8 °C

9. přidáme 200 μ l Ag ^{125}I - ^{125}I -1,25-dihydroxy vitaminu D do všech zkumavek včetně dvou dalších zkumavek určených pro celkovou aktivitu (TC). Pomocí vibračního míchadla jemně promícháme bez napěnění a inkubujeme po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě

10. do všech zkumavek kromě TC-zkumavek přidáme 100 μ l Sac-Cell. Promícháme a inkubujeme při pokojové teplotě po dobu 30 minut

11. do všech zkumavek kromě TC-zkumavek přidáme 4 ml zředěného promývacího roztoku WASHBUF SOLN a centrifugujeme při rychlosti 2000 g po dobu 20 minut

12. supernatanty dekantujeme (kromě TC-zkumavek) a otočené zkumavky ponecháme odkapat do absorpční podložky po dobu 1 minuty

13. změříme všechny zkumavky v gamačítači Berthold LB2104 po dobu minimálně 1 minuty

3.2.8. MĚŘENÍ DALŠÍCH PARAMETRŮ

Biointaktní parathormon byl analyzován pomocí metody ECLIA (ROCHE, analyser MODULAR SWA).

Koncentrace BNP (Brain natriuretic peptide) a troponinu I (cTnI) byly stanoveny pomocí chemiluminiscenční metody (UniCel DxC 880i – Beckman Coulter analyzer).

Hladiny sRAGE byly měřeny pomocí metody ELISA: sRAGE (Quantikine, RD Systems, Minneapolis, MN, USA, www.rndsystems.com).

Sérový kreatinin byl stanoven pomocí Jaffé metody (Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Germany). Globální funkce ledvin (eGFR) byla spočítána pomocí MDRD vzorce (308).

Celkový protein ve 24- hod. sběru moči byl stanoven pomocí Roche Modular System (pyrogallol red) (Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Germany).

Celkový cholesterol byl stanoven enzymatickou metodou (Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Germany).

C-reactive protein (CRP) byl stanoven pomocí turbidimetrie (Roche Diagnostics, Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Germany).

Orosomucoid (acidic α 1-glycoprotein) a α -2 Macroglobulin byly změřeny nefelometricky (Image, Beckman Coulter, USA).

Fibrinogen byl měřen pomocí trombinové metody (Clauss).

Albumin byl stanoven fotometricky pomocí bromcresolové zeleně (Roche Diagnostics, Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Germany).

Krevní obraz byl měřen pomocí automatického analyzátoru (Beckman Coulter LH750 Hematology analyzer, Beckman Coulter, USA).

Rutinní biochemická vyšetření byla provedena standardními metodami.

3.3. Echokardiografie

Vyšetření probíhalo vždy přibližně 2 hodiny po odběru krve. Bylo provedeno kompletní dvourozměrné vyšetření v M-modu a Dopplerovské vyšetření, cestou standardních přístupů pomocí Vivid 7 (GE Medical system, Waukesha, Winconsin). M-mode vyšetření proběhlo podle doporučení Americké společnosti pro echokardiografii (396). Hmotnost LK byla stanovena pomocí standardního vzorce: $\text{Hmotnost levé komory} = 0,8 \times (1,04 \times (\text{LVEDD} + \text{PWTd} + \text{SWTd})^3 - (\text{LVEDD})^3) + 0,6$ (396). Výsledné hodnoty byly indexovány na pacientovu výšku^{2,7}, a tak byl stanoven parametr: hmotnostní index levé komory (LVMI). Hypertrofie LK byla definována jako $\text{LVMI} > 46,7 \text{ g/m}^{2,7}$ u žen a $49,2 \text{ g/m}^{2,7}$ u mužů.

Relativní tloušťka stěny LK (RWT), vypočítaná jako: dvojnásobek tloušťky zadní stěny lomeno vnitřní diastolický rozměr LK, byla použita k charakteristice geometrie LK, kterou lze rozdělit do následujících kategorií: normální geometrie LK ($\text{RWT} \leq 0,42$ a normální LVM),

koncentrická remodelace LK (normální LVMI, ale RWT > 0,42), koncentrická hypertrofie LK (zvýšené LVMI a RWT > 0,42) a excentrická hypertrofie LK (zvýšené LVMI a RWT ≤ 0,42). Objemy LK, zahrnující end-diastolický (LVEDV) a end-systolický objem (LVESV), byly stanoveny za použití modifikované Simpsonovy metody, a byly použity k výpočtu ejekční frakce LK.

Dopplerovské charakteristiky plnění LK a diastolická funkce byly hodnoceny pomocí obrazu transmitrálního toku (transmitral flow pattern) s použitím parametrů pulmonárního venózního influxu. (pulmonary venous inflow parameters). U většiny nemocných jsme zaznamenali také mitrální rychlosti (mitral annular velocities). V souladu se současnými doporučeními jsme kategorizovali plnění LK jako: normální, poruchu relaxace, pseudomorální plnění a restriktivní plnění (397). Rozměr levé síně (LAD) byl indexován na tělesný povrch, čímž byl získán parametr LAD/BSA (mm/ m²). U nemocných s mírnou diastolickou dysfunkcí byl mitrální poměr E/A < 0,8, „deceleration time“ E vlny (DT) byl > 200 ms. U nemocných se středně těžkou diastolickou dysfunkcí (stupeň II) byl mitrální poměr E/A 0,8 - 1,5 (pseudonormální) a s poklesem ≥ 50% během Valsalvova manévru. Těžkou diastolickou dysfunkcí (stupeň III), neboli restriktivní plnění, charakterizuje plnění LK s poměrem E/A ≥ 2, DT < 160 ms (397).

3.4. STATISTICKÁ ANALÝZA

3.4.1. FGF23, matrix-metaloproteinázy a KV anamnéza u nemocných s CKD 1-5. Průřezová studie.

Statistické analýzy byly provedeny pomocí softwaru InStat GraphPad (Graphpad Software Inc., San Diego, CA) a Statistica software verze 5.5 (StatSoft Inc). Data prezentujeme jako průměr +/- SD pro kontinuální proměnné a jako procenta pro kategorické proměnné. Srovnání mezi skupinami byla provedena pomocí nepárových t- testů a testu ANOVA pro normálně rozložené kontinuální proměnné a pomocí Mann-Whitney U testu a Kruskal-Wallis ANOVA testu pro proměnné s nenormální distribucí. Proměnné s nenormální distribucí byly podle potřeby ln-transformovány. Korelace mezi analyzovanými parametry byly stanoveny pomocí Spearmanova nebo Pearsonova korelačního koeficientu. Všechny výsledky byly považovány za signifikantní při statistické významnosti : p < 0,05.

3.4.2. PIGF, matrix-metaloproteinázy, EN-RAGE a echokardiografické parametry u nemocných s CKD 2-4. Prospektivní observační studie.

Všechny analýzy byly provedeny pomocí MedCalc 9,3 (MedCalc Software Comp. Mariakerke, Belgium). Biochemické výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SD, v případech nenormální distribuce jsou data prezentována jako mediány a „interquartile ranges“. 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 podle potřeby log-transformovány. Asociace mezi sledovanými parametry byly stanoveny pomocí Pearsonova korelačního koeficientu a následně byla provedena lineární regresní analýza determinantů proměnných ovlivňujících echokardiografické parametry. Všechny proměnné, které byly významně asociovány s echokardiografickými parametry byly zahrnuty do multivariantské regresní analýzy (jednalo se o sérový albumin, hladinu PIGF, celkový sérový cholesterol, 25OHvitamin D, BNP, FGF23, sérový kreatinin, EN-RAGE, PTH, PAPP, Pi, sRAGE, sérové triacylglyceridy, MMP2). Dále byly analyzovány kvalitativní proměnné, jako kouření, anamnéza KV chorob, užívání ACE inhibitorů, a to pomocí Kruskal-Wallisova testu. Ke srovnání vstupních a finálních echokardiografických nálezů u souboru pacientů byl použit Chi-Square Test for Trend (Tabulka 9). Výsledky byly považovány za statisticky významné při $p < 0,05$.

4. VÝSLEDKY

4.1. FGF23, matrix-metaloproteinázy a KV anamnéza u nemocných s CKD 1-5. Průřezová studie.

4.1.1. Vliv renální funkce na hladiny FGF23 a MMPs

Sérové koncentrace FGF23 v jednotlivých stádiích CKD a u kontrol jsou uvedeny v Tabulce 4. Laboratorní změny sérových koncentrací, které se manifestovaly již ve stádiu CKD 2 (oproti zdravým kontrolám) byly následující: snížení albuminémie ($p < 0,0001$), zvýšení hladiny parathormonu ($p < 0,04$) a triacylglycerolů ($p < 0,01$). Od stádia CKD 3 se snižovaly hladiny kalcitriolu ($p < 0,01$), zatímco fosfatémie (průměr 1,4 mmol/l, $p < 0,003$), hladiny hsCRP ($p < 0,01$), orosomukoidu ($p < 0,01$) a FGF23 ($p < 0,002$) se zvyšovaly. Další laboratorní abnormality se objevily ve stádiu CKD 4, a to: vyšší fibrinogen a CaxP součin. Konečně ve stádiu CKD 5 jsme pozorovali elevaci hladin PAPP-A a MMP-2. Naopak hladiny MMP-9 se u CKD oproti kontrolám nelišily.

Pokud jde o výskyt konvenčních KV rizikových faktorů, u jednotlivých stádiích CKD jsme nezjistili rozdíl v hladině celkového cholesterolu, naopak bylo pozorováno mírné zvýšení LDL cholesterolu ($p < 0,02$) a triacylglycerolů ($p < 0,01$) a mírné snížení HDL cholesterolu ($p < 0,04$) s klesající eGFR. Pacienti měli srovnatelné BMI a věk (s výjimkou stádiích CKD 1+2, kde byli nemocní signifikantně mladší).

Tabulka 4: FGF23 u různých stádií CKD. Klinické, demografické a laboratorní charakteristiky studijní skupiny a kontrol

Proměnná +/- sd	Kontroly	CKD 1 – 5	CKD 1 + 2	CKD 3	CKD 4	CKD 5	P:Anova CKD 1-5
Počet nemocných	44	80	23	25	22	10	
Věk (roky)	58+/-10	52+/- 16	40+/-13	53+/-16	58+/-14	60+/-13	ns
M / Ž %	36 vs. 64	46 vs. 54	12 vs. 11	9 vs. 17	12 vs. 10	4 vs. 6	
Kouření %		11	2	3	2	0	ns
BMI (kg/m ²)	25,5+/-4	27,0+/-4	27,2+/-4,4	26,0+/-4	27,6+/-5	27,4+/-2,7	ns
Hypertenze %	0	86	83	54	59	100	p = 0,01
Anamnéza KV chorob %	0	28	4	38	36	50	p = 0,01
DM %	0	19	4	20	27	20	ns
MDRD (ml/s)	1,2+/-0,2	0,7+/-0,5	1,4+/-0,3	0,7+/-0,1	0,4+/-0,2	0,2+/-0,0	p< 0,0001
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

4.1.2. Vztah koncentrací FGF23 a MMPs ke komorbiditám (KV choroby, diabetes

mellitus), k věku, pohlaví, typu renálního onemocnění a substituci vitamínem D

Vyšší koncentrace FGF23 byly nalezeny u pacientů s anamnézou KV chorob, ve srovnání s nemocnými bez této anamnézy (559 vs. 154 RU/ml). Tento rozdíl byl signifikantní i po adjustaci na eGFR a věk ($p < 0,05$). V multivariální analýze korelovala anamnéza KV chorob nejtěsněji s věkem ($r = 0,57$), s koncentrací FGF23 ($r = 0,43$) a inverzně s hladinou triacylglycerolů ($r = -0,37$), $p < 0,05$ pro všechny tři uvedené parametry.

Nemocní s DM měli vyšší hladiny MMP-2, MMP-9, PAPP-A a PTH (i po adjustaci na eGFR). Naopak nebyl nalezen rozdíl mezi hladinami FGF23, sérových fosfátů a kalcitriolu mezi diabetiky a nediatetiky. Byla nalezena pozitivní korelace koncentrací FGF23 ($r = 0,3$, $p < 0,01$), PAPP-A ($r = 0,35$, $p < 0,001$) a PTH ($r = 0,3$, $p < 0,005$) s věkem, zatímco hladina kalcitriolu inverzně korelovala s věkem ($r = -0,4$, $p < 0,002$).

Nemocní substituovaní vitamínem D (23%) měli vyšší hladiny FGF23 (214,7 vs. 523,1, $p < 0,02$), zatímco hladiny kalcitriolu, MMP-2, fosfatémie a eGFR byly srovnatelné s pacienty bez substituce vitamínem D.

4.1.3. Korelace mezi jednotlivými laboratorními markery (Tabulka 5, 6, 7):

Koncentrace FGF23 korelovaly s fosfatémií, ale nikoli s frakční exkrecí fosfátů (FE-Pi). FE-Pi pozitivně korelovala s PTH ($r = 0,3$, $p < 0,04$) a inverzně s eGFR ($r = 0,3$, $p < 0,05$).

V multivariální analýze koncentrace FGF23 korelovaly s hladinami MMP-2 i po adjustaci na věk, eGFR, fosfatémií, koncentraci kalcitriolu a PTH ($r = 0,42$, $p < 0,0001$). Hladina FGF23 korelovala s hladinou kalcitriolu a PTH, i po adjustaci na věk a eGFR ($p < 0,01$ oba). Hladina MMP-2 korelovala s fosfatémií, po adjustaci na věk a eGFR ($p < 0,01$).

Tabulka 5: FGF23 u různých stádií CKD. Korelace laboratorních markerů v univariantsní analýze

	FGF23	MMP-2	PAPP-A	Kalcitriol	Parathormon	Fosfát
FGF23		r= 0,4, p<0,0001	r= 0,3, p<0,002	r= -0,6, p<0,0001	r= 0,3, p<0,005	r= 0,4, p<0,0001
MMP-2	r= 0,4, p<0,0001		r= 0,6, p<0,0001	r= -0,4, p<0,002	r= 0,3, p<0,003	r= 0,3, p<0,004
PAPP-A	r= 0,3, p<0,002	r= 0,6, p<0,0001		r= -0,4, p<0,02	r= 0,3, p<0,006	r= 0,3, p<0,02
Kalcitriol	r= -0,6, p<0,0001	r= -0,5, p<0,002	r= -0,4, p<0,02		r= -0,4, p<0,0002	r= -0,2, p<0,02
Parathormon	r= 0,3, p<0,005	r= 0,3, p<0,003	r= 0,3, p<0,006	r= -0,4, p<0,0002		r= 0,4, p<0,0001
Fosfát	r= 0,4, p<0,0001	r= 0,3, p<0,004	r= 0,3, p<0,02	r= -0,2, p<0,02	r= 0,4, p<0,0001	
Ca x P součin	r= 0,4, p<0,0001	Ns	Ns	r= -0,4, p<0,001	r= 0,4, p<0,001	r= 0,9, p<0,0001
Orosomuroid	r= 0,3, p<0,02	Ns	Ns	ns	r= 0,2 p<0,05	ns
CRP	Ns	Ns	Ns	ns	ns	ns
Hemoglobin	r= -0,4, p<0,001	r= -0,3, p<0,002	r= -0,2, p<0,05	r= 0,3, p<0,02	r= -0,4, p<0,002	r= -0,4, p<0,0002
Triacylglyceridy	r= 0,3, p<0,02	r= 0,3, p<0,02	Ns	ns	ns	ns
Albumin	ns	Ns	r= -0,2, p<0,05	r= 0,5, p<0,0001	ns	r= -0,3, p<0,01
ALP	r= 0,2, p<0,05	Ns	Ns	ns	ns	ns
Fibrinogen	ns	r= 0,3, p<0,01	Ns	ns	ns	r= 0,3, p<0,004
eGFR	r= -0,6, p<0,0001	r= -0,4, p<0,001	r= -0,4, p<0,0001	r= 0,6, p<0,0001	r= -0,8, p<0,0001	r= -0,5, p<0,0001
Věk	r= 0,3, p<0,02	Ns	r= 0,4, p<0,001	r= -0,4, p<0,002	r= 0,3, p<0,005	ns

4.1.4. Shrnutí výsledků

- Anamnéza KV chorob nezávisle a nejtěsněji korelovala s věkem ($r=0,57$), s koncentrací FGF23 ($r=0,43$) a inverzně s hladinou triacylglycerolů ($r= -0,37$), $p<0,05$ pro všechny uvedené parametry
- Hladiny FGF23 ($r=0,3$ $p<0,01$), PAPP-A ($r=0,35$, $p<0,001$) a PTH ($r=0,3$, $p<0,005$) nezávisle korelovaly s věkem, zatímco hladina kalcitriolu inverzně korelovala s věkem ($r=-0,4$, $p<0,002$).
- Hladina FGF23 nezávisle korelovala s hladinou MMP-2 ($r= 0,42$. $p< 0,0001$)
- Hladina FGF23 nezávisle korelovala s PTH a inverzně s hladinou kalcitriolu ($p<0,01$ oba)
- Hladina MMP-2 nezávisle korelovala s fosfátémií ($p<0,01$).

Naše data tedy potvrzují vstupní hypotézu, že existuje nezávislá korelace hladin FGF23 s hladinami MMP-2, kalcitriolu a PTH a dále že nemocní s anamnézou KV chorob mají vyšší hladiny FGF23 (Tabulka 6, Tabulka 7)

Tabulka 6: Faktory asociované s FGF23. Multivariantní regresní analýza (FGF23 jako závislá proměnná), adjustace na věk, MDRD, sérový fosfát)

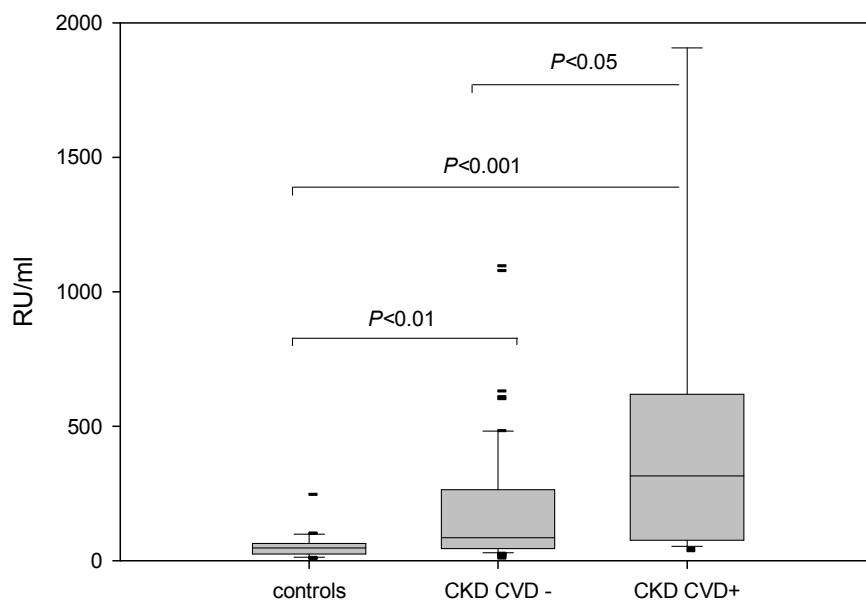
Nezávislé proměnné	B Koeficient	SE	T	P	intercept	R ²
MMP-2	0,003	0,001	1,94	0,05	3,29	0,48
Kalcitriol	-0,021	0,010	-2,01	0,05		
Log PTH	0,481	0,176	2.73	0,01		

Tabulka 7: Faktory asociované s MMP-2. Multivariantní regresní analýza (hladina MMP2 jako závislá proměnná), adjustace na věk, MDRD

Nezávislé proměnné	B koeficient	SE	T	P	intercept	R ²
Fosfáty	103,97	33,11	3,14	<0,01	12,44	0,27

Graf 1: FGF23 u kontrolních a CKD nemocných s a bez anamnézy KV chorob

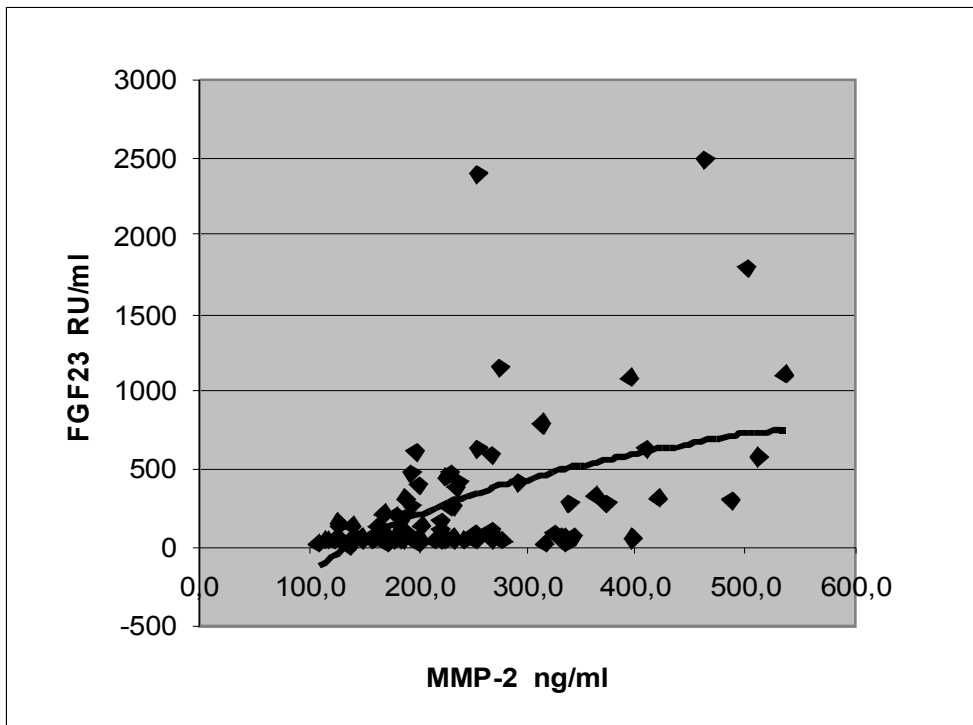
FGF-23: history of CVD



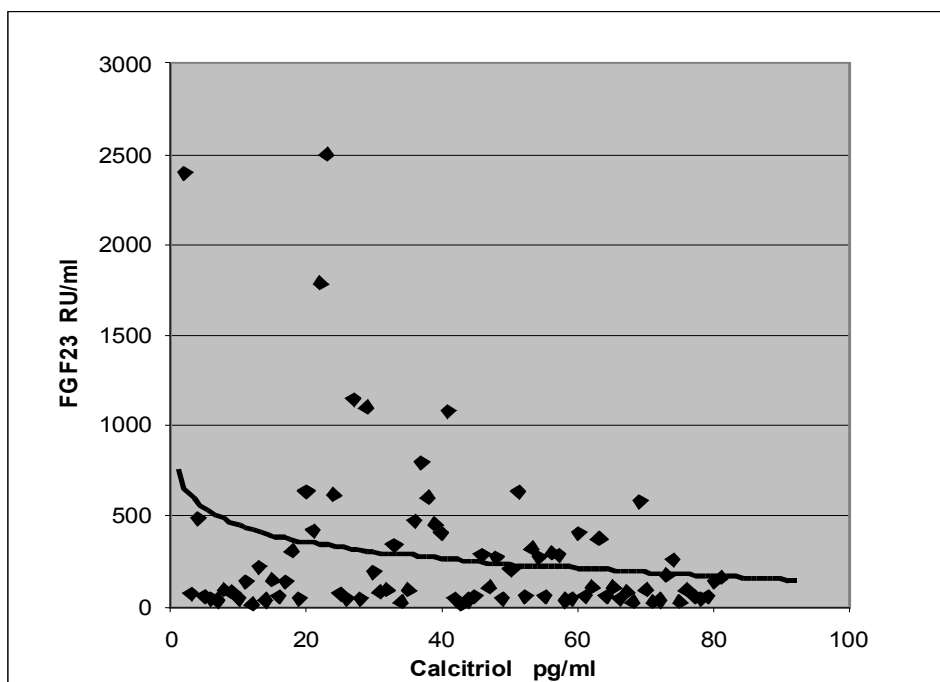
healthy controls and patients with and without history of CVD

Zdravé kontroly a pacienti s anamnézou KV choroby a bez této anamnézy

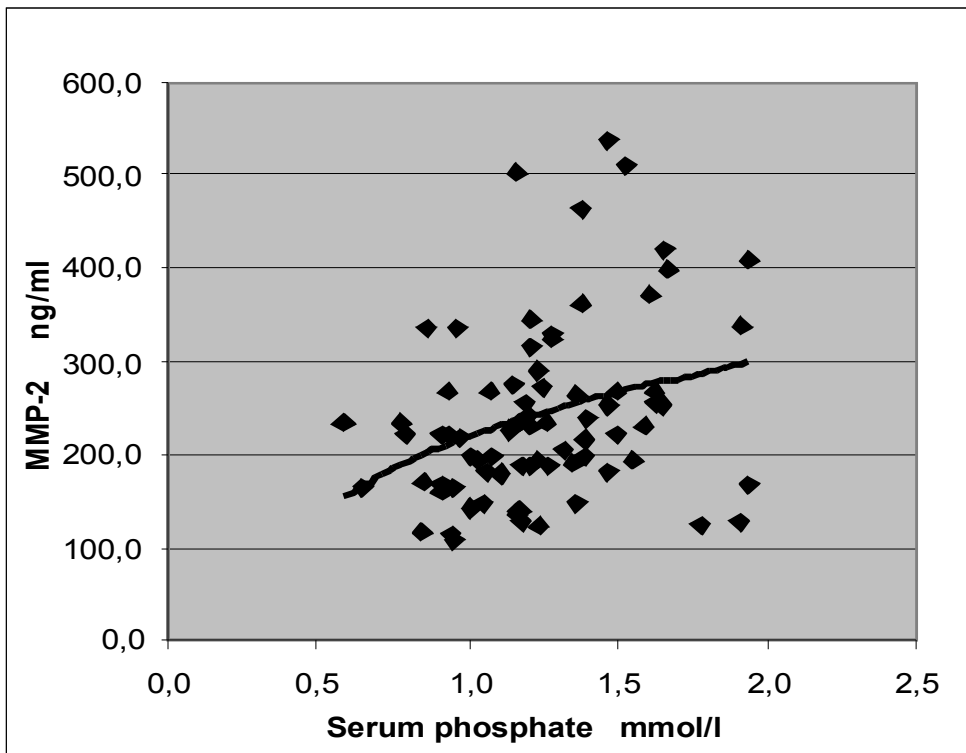
Graf 2: Korelace hladin MMP-2 a FGF23 ($r= 0,42$, $p< 0,0001$)



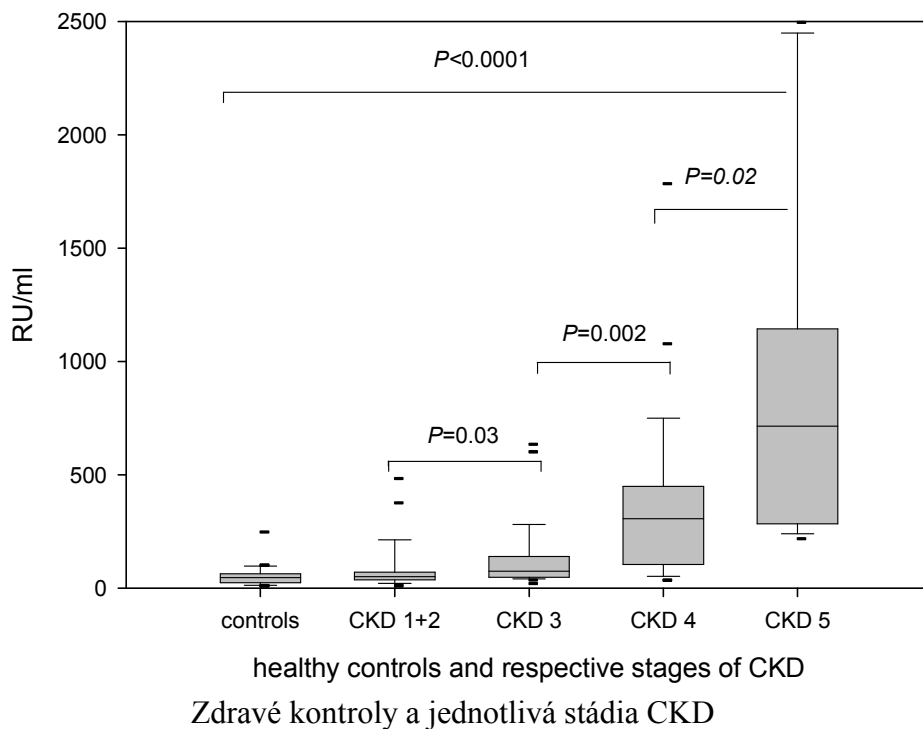
Graf 3: Korelace hladin kalcitriolu a FGF23 ($r= -0,59$, $p< 0,0001$)



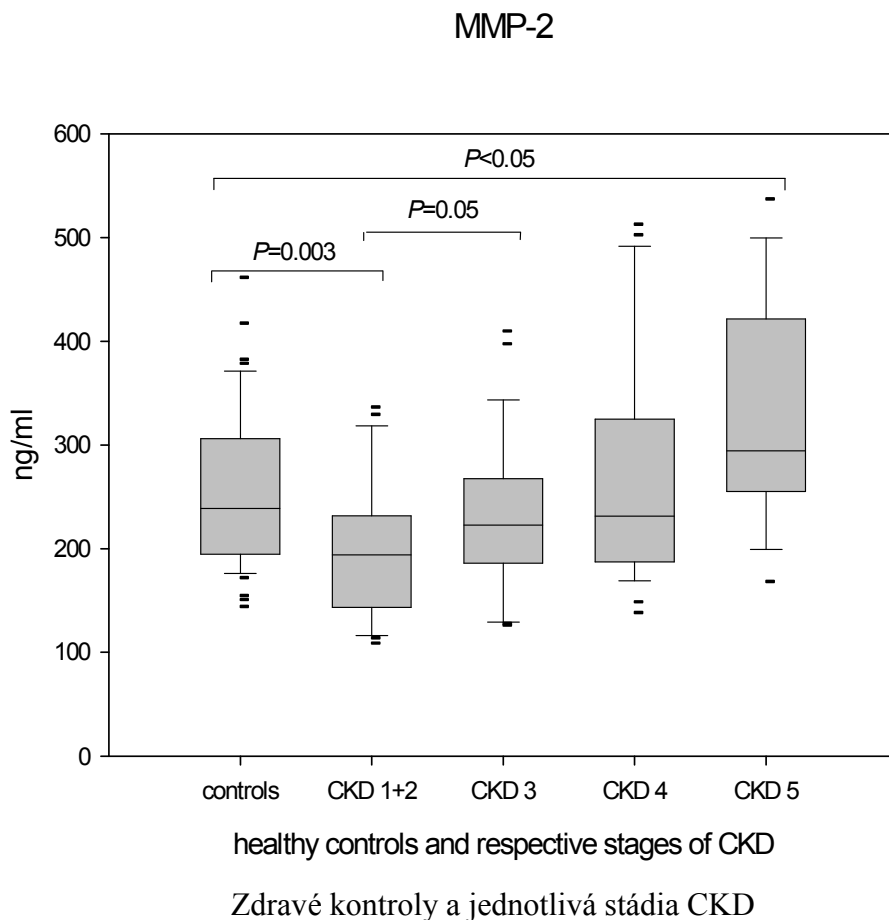
Graf 4: Korelace sérových fosfátů a MMP-2 ($r= 0,3$, $p< 0,004$)



Graf 5: Sérové FGF23 v různých stádiích CKD a u zdravých kontrol
FGF-23



Graf 6: Sérové MMP-2 v různých stádiích CKD a u zdravých kontrol



4.2. PIGF, matrix-metaloproteinázy, EN-RAGE a echokardiografické parametry u nemocných s CKD 2-4. Prospektivní observační studie.

4.2.1. Vstupní echokardiografické parametry studovaného souboru (Tabulka 9).

Zvýšená hmotnost LK byla zjištěna u 29% nemocných. 56,5% pacientů mělo normální geometrii LK, 12,9% splňovalo parametry koncentrické remodelace, 9,7% nemocných mělo známky koncentrické hypertrofie a 21% nemocných mělo známky excentrické hypertrofie. Normální diastolická funkce LK byla nalezena u 25,8% pacientů, porucha relaxace LK u 43,5% pacientů a pseudonormální charakter plnění LK byl popsán u 30,6% pacientů. Nikdo nesplňoval kritéria restriktivní poruchy diastolického plnění LK.

Tabulka 8: PIGF a echokardiografické parametry u CKD. Vstupní klinické a demografické charakteristiky sledovaného souboru

Proměnná ± SD	
Počet nemocných	62
Věk (roky)	62 ± 15
Muži	37
Ženy	25
BMI (kg/ m²)	26,9 ± 3,9
Hypertenze %	88,7
Průměrný systolický TK (mm Hg)	133 ± 16
Průměrný diastolický TK (mm Hg)	80 ± 7
Počet antihypertenzních léků	3 ± 2
Anamnéza KV chorob %	50
DM %	21

Zkratky: BMI Body mass index, TK Krevní tlak, KV kardiovaskulární, DM Diabetes mellitus.

4.2.2. Echokardiografické parametry studovaného souboru po 36 ± 10 měsících (Tabulka 9, Tabulka 10).

Zvýšená hmotnost LK byla zjištěna u 37,1% pacientů. 43,5% nemocných mělo normální geometrii LK, 21% nemocných mělo známky koncentrické remodelace, 9,7% splňovalo parametry koncentrické hypertrofie a 25,6% pacientů mělo známky excentrické hypertrofie. Normální diastolická funkce LK byla nalezena u 24,2% pacientů, porucha relaxace LK u 43,5% pacientů a pseudonormální charakter plnění u 32,3% nemocných. Nikdo nesplňoval kritéria restriktivního diastolického plnění LK. Nezávislé korelace echokardiografických parametrů, laboratorních markerů a krevního tlaku jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 10, Graf 7). Každý parametr sériového echokardiografického měření je uvedený ve třech hodnotách (1: vstupní měření, 2: první kontrolní měření, 3: druhé kontrolní měření). Uvádíme pouze významné korelace. Nezávislé korelace jsou zvýrazněny tučně.

Hmotnostní index LK (LVMI) pozitivně koreloval s PIGF, BNP, systolickým TK a hladinou sérového kreatininu. Hladina BNP pozitivně korelovala také s diametrem levé síně. Hladina EN-

RAGE byla asociována s diametrem levé síně a inverzně s poměrem E/A. Hladina PTH inverzně korelovala s EFLK. Nebyla nalezena žádná nezávislá korelace mezi echokardiografickými parametry a hemoglobinem, hladinou PAPP-A, FGF23 ani vitaminu D. Nebyla zjištěna korelace hladiny PIGF s krevním tlakem.

Tabulka 9: Echokardiografické charakteristiky (%) sledovaného souboru (n = 62)

	Vstupní	S odstupem 36 ± 10 měsíců	Hodnota p „chi square test for trend“
Hmotnostní index LK (LVMI v g/ m^{2.7})			
Normální	71	62,9	p = 0,22 NS
Zvýšený	29	37,1	
Geometrie LK			
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	
EFLK (%)			
Normální	88,7	87,1	p = 0,68 NS
Snížená	11,3	12,9	
Rozměr levé síně (LAD v cm/ m²)			
Normální	98,4	98,4	p = 1,00 NS
Zvýšený	1,6	1,6	
Diastolická funkce LK			
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	
E/A poměr			
Pod 0,8	46,8	48,4	p = 0,06 NS
0-8-1,5	50	40,3	
Nad 2	3,2	11,3	
DTE-MI (ms)			
Nad 200	38,7	62,9	p < 0,01
160-200	37,1	27,4	
Pod 160	24,2	9,7	

Zkratky: E/A poměr Poměr mezi časnou (E) a pozdní (atriálním - A) rychlostí plnění LK, *DTE-MI* „Deceleration Time“ na mitrální chlopni, *LAD* diametr levé srdeční síně, *LK* levá komora

Tabulka 10 : Nezávislé korelace laboratorních a echokardiografických parametrů (stepwise multiple regression)

	LVM1	LVM3	LAD 1	LAD 2	LAD 3	EF1	EF2	EF3	E/A 1	E/A 2	E/A 3
eGFR MDRD	$r = -0,31$	$r = -0,37$	$r = -0,25$	$r = -0,37$	$r = -0,41$	-	-	-	$r = 0,54$	$r = 0,43$	$r = 0,40$
	$p = 0,02$	$p < 0,01$	$p = 0,06$	$p < 0,02$	$p < 0,01$				$p < 0,0001$	$p < 0,01$	$p < 0,01$
Sérový albumin	$r = -0,27$	-	-	$r = -0,33$	$r = -0,33$	-	-	-		-	-
	$p < 0,05$			$p < 0,05$	$p = 0,02$						
Parathormon	-	-	-	-	-	-	$r = -0,47$	-	-	-	-
							$p < 0,01$				
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	$r = 0,42$	$r = 0,51$	$r = 0,27$	$r = 0,30$	$r = 0,50$	-	-	-	-	-	-
	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p = 0,08$	$p < 0,01$						
Systolický 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 vázající protein, DT „deceleration time“ na mitrální chlopi, LAD rozměr levé síně, LVMI left ventricle mass index (index hmotnosti LK), eGFR MDRD glomerulární filtrace „modification of diet in renal disease“, PIGF placentární růstový faktor, r Pearsonův korelační koeficient.

4.2.3. Vliv renální funkce na laboratorní a echokardiografické parametry a jejich změny během sledovaného období (multivariantní regresní analýza) (Tabulka 11, Graf 8).

Funkce ledvin (eGFR) pozitivně korelovala s poměrem E/A a inverzně s LVMI a rozměrem levé síně. Během sledovaného období, jsme spolu s poklesem renální funkce (eGFR) zaznamenali významný nárůst LVMI, rozměru levé síně, hladiny EN-RAGE, FGF23 a BNP, naopak byl zaznamenán pokles v hodnotách EFLK, sérového albuminu, vitamínu D a hemoglobinu. Nebyly zjištěny žádné signifikantní změny v hodnotách krevního tlaku.

Tabulka 11: Změny laboratorních a echokardiografických parametrů během sledovaného období

Parametr	Vstupní	Po 18± 5 měsících	Po 36± 10 měsících	<i>Hodnota p pro vstupní vs. 18 měsíční měření</i>	<i>Hodnota p pro 18 měsíční vs. 36 měsíční měření</i>	<i>Hodnota p pro vstupní vs. 36 měsíční měření</i>
eGFR (MDRD) (ml/s)	0,6	0,57	0,49	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,01
	(0,25-1,6)	(0,25-1,3)	(0,26-2,8)			
Hemoglobin (g/l)	128,5 ± 20,0	128,8 ± 20,7	124,3 ± 18,8	p < 0,01	p < 0,01	NS
Fosfatémie (mmol/l)	1,1	1,16	1,2	NS	NS	NS
	(1,00-1,29)	(1,00-1,45)	(1,00-1,36)			
Parathormon (pg/ml)	5,96	6,34	7,52	NS	NS	NS
	(3,56-9,22)	(4,56- 11,98)	(3,63- 15,59)			
25OH Vitamin D (ng/ml)	23,47 ±8,91	25,04 ±9,61	20,87 ±7,79	NS	p < 0,01	p < 0,02
FGF23 (RU/ml)	89,6	100,1	127	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,0001
	(64,8- 167,1)	(73,0- 228,8)	(78,3- 282,4)			
PAPP-A (mIU/l)	8,3	8.VII	9,3	NS	NS	NS
	(7,0-10,2)	(7,6-10,5)	(7,5-12,6)			
sRAGE (pg/ml)	976,3	919,1	1040,7	NS	NS	NS
	(720,6- 1495,2)	(643,9- 1336,3)	(719,1- 1375,1)			
EN-RAGE (ng/ml)	160,5	255,2	269,8	p < 0,05	NS	p < 0,001
	(100,5- 240,3)	(164,6- 297,0)	(163,0- 326,3)			
PIGF (pg/ml)	10,8	11,05	12,5	p < 0,02	NS	NS
	(7,8-14,2)	(8,5-15,6)	(8,5-14,7)			
MMP-2 (ng/ml)	214,5 ±50,6	206,5 ±39,2	221,9 ±61,6	NS	NS	NS
Troponin I (ng/ml)	0,01	0,01	0,01	NS	NS	NS
	(0,01-0,01)	(0,01-0,01)	(0,01-0,01)			

BNP (pg/ml)	30	57	77	p < 0,01	NS	p < 0,0001
	(15,0-91,0)	(27,8-107,3)	(40,0-195,0)			
Index hmotnosti LK (LVMI g/m^{2.7})	43,6 ± 14,6	45,3 ± 16,0	45,7 ± 13,4	NS	NS	p < 0,05
Ejekční frakce LK (%)	64,7 ± 7,8	64,5 ± 5,8	62,7 ± 8,0	p < 0,05	NS	p < 0,05
Rozměr levé síně (cm/m²)	2,14 ± 0,64	2,05 ± 0,55	2,19 ± 0,50	NS	NS	p < 0,01
E/A poměr	0,83	0,83	0,81	NS	NS	NS
	(0,67 - 1,14)	(0,69 - 0,98)	(0,72-1,04)			

4.2.4. Laboratorní parametry pacientů s anamnézou KV onemocnění.

Anamnéza KV onemocnění byla přítomna u 50% nemocných. Tito nemocní měli vyšší hmotnostní index LK (LVMI, p < 0,02), vyšší sérový kreatinin (p < 0,01), hladiny triacylglyceridů (p < 0,05), FGF23 (p < 0,02) a PAPP-A (p < 0,05). Nemocní s anamnézou KV chorob naopak měli nižší hladiny 25OHvitaminu D (p < 0,05) a nižší albuminémii (p < 0,01) ve srovnání s pacienty bez anamnézy KV chorob. Vztah hladiny PIGF k anamnéze KV chorob byl hraničně významný (p = 0,05).

4.2.5. Shrnutí výsledků

Během sledovaného období jsme zaznamenali následující změny (vstupní nálezy vs. finální nálezy po 36±10 měsících):

- zvýšený LVMI u 29% vs. 37,1% nemocných
- abnormální LV geometrii u 43,5% vs. 56,5%
- abnormální diastolickou funkci LK u 74,1% vs. 75,8% nemocných.

Tyto trendy však nebyly statisticky signifikantní.

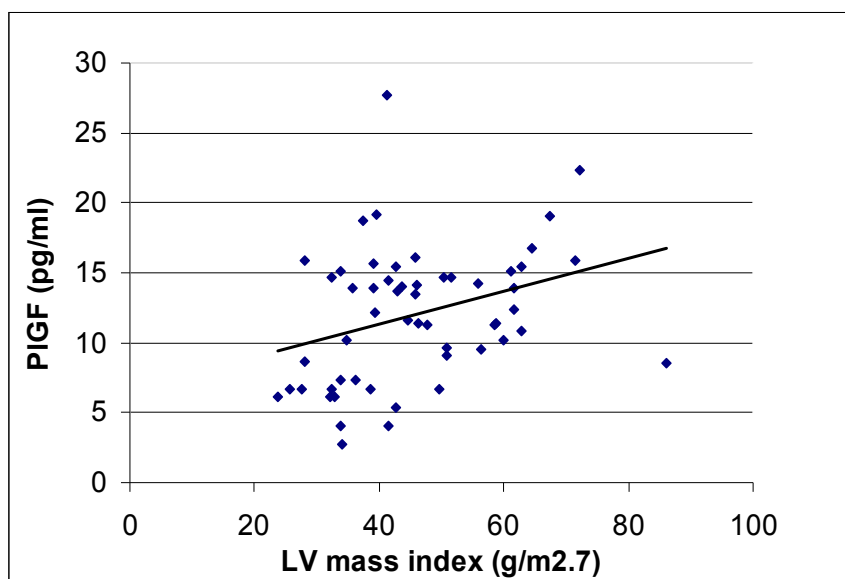
- LVMI nezávisle korelovalo s hladinami PIGF, BNP, systolickým TK a funkcí ledvin
- Diastolická funkce LK nezávisle korelovala s hladinami EN-RAGE a funkcí ledvin

-Během sledovaného období jsme spolu se snižující se funkcí ledvin (eGFR) zaznamenali zvýšení LVMI, rozměru levé síně, EN-RAGE, FGF23 a BNP

-Během sledovaného období jsme spolu se snižující se eGFR zaznamenali snížení EFLK, hladiny albuminémie, hladiny vitamínu D a hemoglobinu.

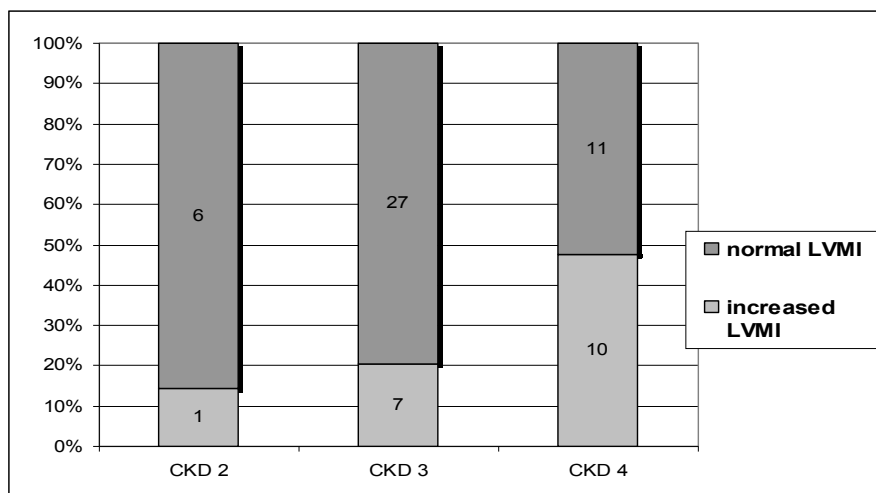
Naše data tedy potvrzují vstupní hypotézu, že PIGF nezávisle koreluje s LVMI u nemocných s CKD 2-4. Nebyla zjištěna korelace PIGF s tradičními rizikovými faktory. Diastolická funkce LK nezávisle korelovala s hladinami EN-RAGE.

Graf 7: 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)

Graf 8: Index hmotnosti LK ($\text{g/m}^{2.7}$) v různých stádiích CKD.



Použita vstupní data. LK. LK: levá komora, CKD: chronic kidney disease

5. DISKUSE

Naše data dokumentují nezávislou asociaci hladin FGF23 a MMP-2, což naznačuje možné spojení mezi dysbalancí Ca-P metabolismu, oxidačním stresem a KV onemocněním, a to již od stadia CKD 3. Nemocní se zvýšeným FGF23 a MMP-2 mají vysoké riziko vývoje KV komplikací a progresu CKD. Tyto pochody by alespoň zčásti mohly být způsobeny deficitem kalcitriolu, zvláště u případů vysokého FGF23. Těmto nemocným by měla být poskytnuta komplexní preventivní péče již od časných stádií CKD, která by ovlivňovala tradiční i specifické KV rizikové faktory (včetně Ca-P dysbalance a mikrožánětu).

Dále naše data popisují významnou a nezávislou korelaci hladin PIGF se zvýšenou hmotností LK u nemocných s mírnou až středně pokročilou CKD. Hladiny EN-RAGE nejspíše 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.

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

V průřezové studii u 80 nemocných s CKD, dosud nezávislých na dialýze, jsme našli vyšší hladiny FGF23, PAPP-A a MMP-2 (ale nikoli MMP-9), ve srovnání se zdravými kontrolami. Tyto parametry inverzně korelovaly s eGFR, což již bylo dříve popsáno (384, 223). Příčina a role těchto zvýšených hladin není dosud zcela jasná, přičemž jistou roli zřejmě hraje redukováná renální clearance a / nebo kompenzatorně zvýšená odpověď na minerálovou dysbalanci a mikrožánět. Zvýšení FGF23 je zřejmě kompenzatorní reakcí na retenci fosfátů u CKD. V naší studii hladiny FGF23 pozitivně korelovaly s fosfatémií, ale nekorelovaly s frakční exkrecí fosfátů, nejspíše vlivem sníženého počtu viabilních nefronů. Funkce ledvin (eGFR) a parathormon jsou tak pravděpodobně nejsilnějším prediktorem fosfaturie (FE-Pi). Naše data ukazují na nezávislou korelaci hladin FGF23 a kalcitriolu, což je ve shodě s literaturou (223). Zvýšený FGF23 je nejspíše nejsilnějším prediktorem deficitu kalcitriolu, a to nezávisle na zásobách vitamínu D, fosfatémií a eGFR. Zdá se, že FGF23 je jedním z prvních stimulů časně patogenezy sekundární hyperparathyreózy (SHPT), KV chorob a progresu CKD (223).

Podle analýzy našich dat anamnéza KV chorob nezávisle a nejtěsněji korelovala s hladinou FGF23, s věkem a s hladinou triacylglycerolů, což již bylo popsáno (385). Hladiny FGF23, PAPP-A a PTH nezávisle korelovaly s věkem, zatímco hladina kalcitriolu inverzně korelovala s věkem, což by mohlo naznačovat podpurný vliv stárnutí na oxidační stres, mikrožánět a CKD-MBD. Hladina MMP-2 nezávisle korelovala s fosfatémií a s hladinou FGF23. Korelaci MMP-2 s

fosfatémií není snadné interpretovat. Zvýšená fosfatémie stimuluje cévní kalcifikace cestou indukce osteoblastické diferenciaci VSMCs. Je možné, že VSMCs jsou takto nasměrovány k sekreci různých cytokinů podporujících mineralizaci v odpovědi na zvýšenou fosfatémií.

Hladiny FGF23 v naší skupině rostly dříve než hladiny MMP-2, což může znamenat, že by FGF23 mohlo být jedním ze stimulů zvýšené produkce MMP-2. Sapienza ve své práci ukazuje, že základní FGF (člen stejné rodiny jako FGF23) zvyšuje produkci a expresi MMP-2 v nestabilních karotických plátech (353). V naší studii hladina FGF23 nezávisle korelovala s hladinou PTH, což je ve shodě s literaturou (386). Hladina parathormonu rostla dříve než nastaly změny v hladinách kalcitriolu, FGF23 nebo Ca a Pi. Toto pozorování možná odráží velmi citlivou reakci PTH na deficit kalcitriolu, když i mírný pokles hladiny kalcitriolu vede ke zvýšení PTH a následné rychlé stimulaci syntézy kalcitriolu. V jiných pracích je popisováno zvýšení FGF23 jako nejčasnější laboratorní projev CKD-MBD (387).

Nezaznamenali jsme signifikantní rozdíly mezi hladinami celkového cholesterolu, hsCRP, věkem, kouřením nebo BMI mezi jednotlivými stupni CKD, což naznačuje, že některé netradiční KV rizikové faktory u CKD převažují nad tradičními rizikovými faktory.

Terapeutické snížení hladin FGF23 by mohlo zlepšit KV prognózu nemocných s CKD. Toho by mohlo být dosaženo snížením fosfátové zátěže, např. snížením příjmu fosfátů, po totální parathyroidektomii nebo podáváním sevelameru. Zvýšená fosfatémie je nepochybným rizikovým faktorem cévních kalcifikací a mortality u CKD, proto doporučení NKF K/DOQI pro stadium CKD 3-4 doporučují restrikcii fosfátů a užívání fosfátových vazáčů při fosfatémií $>1,49$ mmol/l. Přitom je ale již fosfatémie $>1,13$ mmol/l spojována se zvýšeným rizikem úmrtí a toto riziko lineárně stoupá s každým dalším zvýšením fosfatémie o $0,16$ mmol/l (388). V naší práci jsme našli pozitivní korelaci hladiny PTH s fosfaturií a inverzní korelaci s hladinou kalcitriolu. Naopak hladiny FGF23 nekorelovaly s fosfaturií, ale byly inverzně asociované s hladinami kalcitriolu. Tyto nálezy mohou znamenat, že PTH by mohlo být efektivnější v podpoře fosfaturie, zatímco FGF23 hraje důležitější roli v ovlivnění hladin kalcitriolu. Proto by mohla být kontrola příjmu fosfátů vhodná již od časnějších stádií CKD, tím by se zvýšily hladiny kalcitriolu a snížily hladiny PTH a FGF23 již u nemocných s normální fosfatémií. Bylo by vhodné monitorovat hladiny FGF23 a s jejich pomocí vést dietní restrikcii fosfátů již v časných stádiích CKD, i tehdy když je fosfatémie ještě v normě.

Hladiny matrix-metaloproteináz (PAPP-A a MMP-2), ve shodě s publikovanou literaturou, narůstají až v pozdějších stádiích CKD, což může napovídat, že v časných stádiích CKD jsou významnější jiné KV rizikové faktory. V naší studii hladiny PAPP-A ani MMP-2 nekorelovaly se

sérovými lipidy ani s hsCRP, což je ve shodě s literárními údaji (342). Suplementace vitamínem D by mohla vést k poklesu hladin MMP-2 a MMP-9 (356).

Naše práce byla limitována několika faktory: Z důvodu průřezového charakteru studie jsme nesledovali dlouhodobé změny klinického stavu, renální funkce a markerů Ca-P metabolismu. Neposuzovali jsme dále variabilitu příjmu fosfátů. Hladinu FGF23 jsme měřili pomocí kitu ELISA (C-terminální FGF23 fragment, který se pravděpodobně u CKD kumuluje). Na druhou stranu ale hladiny C-terminálního FGF23 úzce korelovaly s hladinami “full-length FGF23” (389) a provedli jsme statistickou korekci na eGFR.

Lze shrnout, že naše data potvrzují vstupní hypotézu, že existuje nezávislá korelace hladin FGF23 s hladinami MMP-2, kalcitriolu a PTH a dále že nemocní s anamnézou KV chorob mají vyšší hladiny FGF23.

5.2. PlGF, matrix-metaloproteinázy, EN-RAGE a echokardiografické parametry osob s CKD 2-4. Prospektivní observační studie.

V našem dalším souboru nemocných s mírnou až středně pokročilou CKD jsme zaznamenali vysokou prevalenci remodelace LK, zvýšeného LVMI, přičemž frekvence těchto abnormalit byla vyšší 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 (Tabulka 11, Graf 8). Autoři Levin a spol. zaznamenali prevalenci HLK u 26,7% nemocných s GFR > 50 ml/min, u 30,8% nemocných s GFR 25 - 49 ml/min a u 45,2% nemocných s pokročilou CKD (GFR <25 ml/min) (391). Tyto nálezy jsou obdobné našemu pozorování. Celkově jsme během sledovaného období zaznamenali zvýšený LVMI u 29% vs. 37,1% nemocných (bazální vs. finální data po 36±10 měsících). Vysoká prevalence zvýšeného indexu LVMI u nemocných s CKD byla v literatuře opakovaně popsána (390), ale studie jsou bohužel obtížně srovnatelné, především kvůli různé definici HLK, rozdílným charakteristikám sledované populace a také kvůli různé kontrole TK, včetně rozdílné míry užívání ACE inhibitorů a/nebo AR blokátorů. Abnormální LV geometrii jsme popsali u 43,5% vs. 56,5% a abnormální diastolickou funkci LK u 74,1% vs. 75,8% nemocných (bazální vs. finální data po 36±10 měsících). Autoři Cai et al. sledovali nemocné s CKD 3-5 po dobu 1 roku a popsali nárůst prevalence hypertrofie LK ze 40,3% na 48,9% a nárůst objemu levé síně (korelát diastolické dysfunkce) (380). Autoři Seifert et al. popsali u nemocných s CKD 3, sledovaných 12 měsíců, zvyšující se LVM, perzistující diastolickou dysfunkci LK, a to při stabilní renální funkci a krevním tlaku. Změna poměru FGF23/klotho silně korelovala se změnou LVM (381). V jiné studii u

nemocných s CKD 4-5 byla diastolická dysfunkce popsána u 85% nemocných a 35% mělo stupeň ≥ 2 diastolické dysfunkce. Věk >75 let, anamnéza IM, diastolická dysfunkce a troponin T byly nezávislými prediktory mortality. (382). U nemocných s CKD 3-4 (studie CREATE) byl na počátku studie zjištěn výskyt HLK u 47% osob, během 2 let se LVMI nezměnil, ale geometrie LK fluktovala. Kompletní korekce hemoglobinu pomocí erythropoetinu zhoršovala prognózu nemocných s HLK (383).

LVMI v našem souboru nezávisle koreloval se systolickým TK, BNP, hladinou sérového kreatininu a PIGF. Vztah hladin BNP k LVMI a k výskytu KV onemocnění již byl v literatuře popsán, stejně jako byla popsána korelace LVMI a hodnot BNP, CRP a troponinu T u nemocných ve stádiu CKD 3–4 (398). V naší studii jsme však významnou korelaci mezi LVMI a hladinou troponinu ani CRP nepotvrdili. Korelace hladin PIGF s hmotností LK byla dosud popsána jen ve zvířecím modelu CKD. V experimentu u zvířat (326) bylo zjištěno, že myši nadměrně exprimující PIGF, měly vyšší odpověď kardiální hypertrofie, vyšší hustotu kapilární sítě a zvýšený obsah fibroblastů v srdci, jako odpověď na stres. Myši zvýšeně exprimující PIGF vykazují kardiální růst, který je chrání před rozvojem srdečního selhání. Naopak, PIGF(–/–) myši uhynuly na srdeční selhání do 1 týdne od počátku tlakové zátěže. PIGF zřejmě působí cestou endoteliálních buněk a fibroblastů, sekundárně stimuluje myocyty pomocí parakrinních faktorů jako je interleukin-6. Bylo popsáno, že PIGF stimuluje angiogenezi v okraji infarktového ložiska (399), podporuje aterosklerotické ztlustění intimy a akumulaci makrofágů. PIGF je také spojováno s dlouhodobou predikcí koronárního srdečního onemocnění (400). V lidských aterosklerotických lézích je exprese PIGF asociována se zánětem a destabilizací plátu. Podání anti-PIGF protilátek zpomaluje progresi AS plátu do nestabilních lézí (401). Bylo popsáno, že exprese PIGF v lidských cévních endoteliálních a hladkých svalových buňkách, je indukována angiotensinem II a aldosteronem a naopak mineralokortikoidní antagonisté inhibují expresi PIGF v cévách (87). Bylo zjištěno, že hladiny PIGF jsou významně vyšší ve stádiích CKD 1–5D, ve srovnání s kontrolami (271). Zvýšené hladiny PIGF byly také nalezeny u nemocných s anamnézou KV příhody, ve srovnání s nemocnými bez KV anamnézy (271), tyto nálezy se shodují s naším pozorováním.

Hypertrofie LK je silným prediktorem KV příhod a rizika progresu CKD do dialyzačního stádia. Je zajímavé, že několik studií u nemocných s CKD neprokázalo korelaci mezi výší TK a hmotností LK (402), což naznačuje, že klíčovou roli ve vývoji HLK mohou hrát jiné myokardiální fibrózu vyvolávající neuro-humorální faktory. Dle dostupné literatury, hmotnost LK u nemocných s CKD významně koreluje s albuminémií, s hladinou FGF23 (177) a s CaxPO4 součinem (403). Ve

studii s 3879 CKD pacienty byly vyšší hladiny FGF23 asociovány s rizikem úmrtí (385). FGF23 v experimentu způsobilo hypertrofii izolovaných potkaních kardiomyocytů a podávání blokátoru FGF-receptoru hypertrofii LK zmírňovalo. Podle našich dat však hladiny FGF23 korelovaly s LVMI pouze v univariantsní analýze. Naopak inverzní korelace hladin PTH s EFLK byla významná i v multivariantsní analýze. Ve zvířecím modelu byla popsána asociace hladin PTH s myokardiální hypertrofií, fibrózou a vyšším skóre koronárních lézí (386).

Diastolická dysfunkce LK byla popsána již v časných stádiích CKD 1-2 (397). Závažnost CKD je nejvýznamnějším nezávislým prediktorem zvýšeného plního tlaku LK (404). Naše vstupní data u souboru nemocných s CKD 2-4 dokumentují normální hodnoty diastolické funkce u 25,8% nemocných, poruchu relaxace u 43,5% a pseudonormální charakter plnění LK u 30,6% nemocných (Tabulka 9). Zaznamenali jsme pozitivní korelaci hladiny EN-RAGE s rozměrem levé síně a inverzní korelaci hladiny EN-RAGE s poměrem E/A. Podle dostupné literatury přispívá EN-RAGE (také nazývané S100A12) k zánětu a ateroskleróze a časná blokáda RAGE podáváním statinů může předcházet zánětu v ateroskleróze (300). Hladiny S100A12 u CKD korelují s CRP a inverzně s sRAGE (271). Mezi sRAGE a LVMI byla u CKD nemocných popsána inverzní korelace (405), v naší studii jsme však tuto korelaci neprokázali.

Během sledovaného období jsme spolu se snižující se funkcí ledvin zjistili zvýšení LVMI, rozměru levé síně, EN-RAGE, FGF23, BNP, snížení EFLK, albuminémie, hladiny vitamínu D a hemoglobinu, což je v souladu s literaturou (38, 40, 91, 397, 403). Dále jsme během sledovaného období zaznamenali rostoucí procento pacientů se zvýšeným LVMI, abnormální geometrií LK, sníženou EFLK a diastolickou dysfunkcí LK (Tabulka 11), tyto trendy však nebyly statisticky signifikantní, možná díky limitované době sledování (36 ± 10 měsíců). Částečné regrese HLK u nemocných s CKD je v současné době možné dosáhnout intenzivní léčbou antihypertenziv a terapií anémie (391, 41). Původně nadějně vyhlížející parikalcitol v experimentu (studie PRIMO) nevedl po 48 týdenním podávání k regresi LVMI ani ke zlepšení diastolické funkce (183). Ke specifickému zacílení na léčbu HLK u CKD nemocných nadále chybí hlubší pochopení molekulárních pochodů způsobujících HLK u CKD (i v nepřítomnosti tlakových nebo volumových změn). Randomizované kontrolované studie jsou potřeba k objasnění, zda HLK, srdeční fibróze a elektrické nestabilitě, lze předejít intenzivní multifaktoriální léčbou, započatou v časných stádiích CKD. Tato léčba by mohla zahrnovat i farmakologické snížení hladin PIGF, FGF23 nebo EN-RAGE.

V naší prospektivní observační studii jsme realizovali laboratorní analýzy vzorků odebraných v těsné časové souvislosti s echokardiografickým vyšetřením, s cílem analyzovat změny v čase a

vzájemné korelace těchto parametrů. Je potřeba připustit limitace naší studie: díky relativně vysokému počtu sledovaných proměnných a použitých statistických metod u omezeného počtu nemocných, nelze vyloučit možnost falešně pozitivních výsledků. Použili jsme ale náležitou metodu multifaktoriální adjustace k detekci nezávislých korelací proměnných. Nehodnotili jsme ROC křivky, neboť ty jsou považovány za relevantní teprve u počtu sledovaných subjektů nad 100. Další limitací naší práce byla skutečnost, že hodnocení „filling pattern“ bylo provedeno pouze z transmitrálního toku. Přitom ale bylo odlišení normálního vzorce diastolického plnění od pseudonormálního provedeno zkušenými kardiology, kteří do úvahy vzali také pulmonální venózní průtok, dilataci levé síně a u některých nemocných také Dopplerovské mapování. Měření „mitral annulus excursion velocity“ pomocí tkáňového Doppleru jsme systematicky neprováděli, neboť v době zahájení studie (v roce 2005) nebyla tato metoda ještě součástí rutinního vyšetření.

5.3. Jak snížit KV mortalitu u CKD.

V nefrologii je bohužel k dispozici málo intervenčních studií. Donedávna byli nemocní s CKD rutinně vylučováni z velkých studií KV mortality a morbidity, je tedy k dispozici poměrně málo dat z kategorie “evidence-based”. Klinická doporučení existují odděleně pro léčbu srdečního selhání a renálního selhání. Z důvodu komplexní orgánové interakce musí léčba KRS vycházet z patofyziologie.

Prvním opatřením musí být pečlivá kontrola TK. CKD je spojena s vyšší aktivitou sympatiku a systému renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS) (116, 92). Fagocyty produkují katecholaminy (406), enzym renaláza pocházející z ledvin katabolizuje cirkulující katecholaminy a při jeho nedostatku se poločas katecholaminů prodlužuje. β blokátory zpomalují progresi CKD, mají příznivý vliv na srdeční funkci a uremickou kardiomyopatii a snižují mortalitu (407). Moderní β blokátory (carvedilol, nebivolol) mají méně metabolických nežádoucích účinků a měly by být u CKD více používány (407). Blokátory RAAS příznivě působí na remodelaci komor a myokardiální fibrózu, snižují úroveň oxidačního stresu a zánětu, snižují výskyt arytmií a zlepšují KV prognózu, zvláště při poruše funkce LK (studie RENAAL a IDNT (106, 408). ACEI i ARB snižují progresi albuminurie a zpomalují pokles GFR (274), zmírňují tuhost cévní stěny tepen - jsou kardio- i renoprotektivní nezávisle na snížení TK. Léčba spironolaktonem u anurických HD nemocných účinně snížila TK, a to bez vývoje hyperkalémie (90). Aldosteron podporuje tvorbu srdeční fibrózy a kardiomyopatie (117). Vzestup natrémie v přítomnosti aldosteronu potlačuje produkci NO v endotelu (409). Souvislost sodíku a endoteliální dysfunkce ukazuje na nové léčebné cíle. Redukce příjmu soli je nutná (80).

Všechna běžná antihypertenziva redukuje riziko KV příhod a snížení TK zpomaluje progresi CKD (410). Hypertenze je prediktorem mortality CKD pacientů, ale u nemocných s KV poškozením je spíše nízký než vysoký TK spojen s vyšší mortalitou (411). Analýza TK u 651 749 osob s CKD ukázala nejnižší mortalitu pro TK 130/70 – 159/89 mm Hg. Naopak nejvyšší mortalitu měli nemocní s oběma sTK i dTK zároveň velmi nízko nebo velmi vysoko. (412, 413). Metaanalýza popsala J point dTK 84 mmHg pro celkovou mortalitu. Příčinou je zřejmě citlivost koronární cirkulace na pokles dTK (412). Snížení sTK ke 120 mmHg je reno- i kardioprotektivní. sTK<120 mmHg však zvyšuje riziko nemocných se srdečním postižením (411). Různá antihypertenziva mohou mít různý vliv na KV morbiditu. U HD nemocných byly KV komplikace ve větvi s lisinoprilem častější než ve větvi s atenololem (414). V metaanalýze byl irbesartan lepší než amlodipin v oddálení renálního cíle, ale amlodipin byl lepší v prevenci cévní mozkové příhody a infarktu myokardu (415).

Zlepšení vnitřního prostředí zlepšuje systolickou funkci LK u nemocných po transplantaci ledviny (416), to platí zejména pro nemocné, kteří byli na dialýze jen po dobu kratší 17 měsíců. Echokardiografie by u CKD nemocných měla být prováděna každých 12 měsíců, ev. v budoucnu i akustická denzitometrie, k detekci myokardiální fibrózy.

Hladina fosfátů je prediktorem KV mortality a to i u obecné populace (140). Mechanismus je komplexní a zahrnuje vliv FGF23, klotho a vitamínu D (221). Endotel exprimuje receptory pro vitamin D a produkuje aktivní vitamin D. Srdce a cévy jsou cílovými orgány vitamínu D (214). Probíhají studie zjišťující, zda normalizace hladin zásobního 25-hydroxyvitamínu D a léčba analogy vitamínu D má vliv na KV prognózu. Žádná léčba nebyla dosud prokázána jako účinná v léčbě cévních kalcifikací, které se považují za ireverzibilní. Některé fosfátové vazače možná zpomalují progresi VC (246), nejdůležitější ale zůstává prevence. Za nejdůležitější je považována kontrola fosfatémie. V časných stádiích CKD je fosfatémie u většiny pacientů v normě, ale i hodnoty na horní hranici normálních hodnot se pojí s vyšším výskytem cévních kalcifikací (VC) a zvýšenou mortalitou (388).

Aktuálně používáme ke snížení fosfatémie (i) dietní omezení fosfátů (ii) fosfátové vazače a kalcimimetika a (iii) ev. zvýšení dávky dialýzy u CKD 5D. Příjem fosfátů u CKD by měl být max. 1000 mg denně, bez vzniku proteinové malnutrice (KDIGO, Tabulka 3). Je také nutné věnovat pozornost kvalitě jídla. Neorganické fosfáty z aditiv v průmyslově zpracovaných pokrmech typu „fast food“ se (oproti organickým fosfátům) rychleji vstřebávají a vedou k přetížení fosfáty. Rozhoduje i zdroj fosfátů (zvířecí vs. rostlinný) a také poměr protein/fosfor (biologická dostupnost) v potravě. Aditiva na bazi fosforu jsou organizací FDA považovaná za bezpečná , takže regulační

dohled nad nimi je slabý. Liberální konzumace chemikálií s fosfáty má nejasné a možná neblahé důsledky pro zdraví (376).

Největším problémem fosfátových vazačů je nedostatečná compliance nemocných. Všechny dostupné vazače (kalciové a magnésiové soli, sevelamer, lantan) účinně snižují fosfatémii, prognózu nemocných však zřejmě nezlepšují. Sevelamer má ve srovnání s kalciovými vazači pleiotropní účinky, jako je zmírnění oxidačního stresu a zánětu, snížení hladiny uremických toxinů, a tak zmírňuje progresi VC u nemocných s CKD (202, 246). Kalciové vazače mohou vést k přetížení kalciem, doporučuje se tedy nepřekračovat dávku 1500 mg kalcia za den. Vazače na bázi magnésia jsou přijatelnou alternativou.

Tabulka 3: Doporučené cílové hodnoty parametrů u CKD [KDIGO 2009]

Parametr	Doporučení
Intaktní PTH (pmol/l)	CKD st. 3 (eGFR 30-59 ml/min): 3,85-7,7
	CKD st. 4 (eGFR 15-29 ml/min): 7,7-12,1
	CKD st.5-5D (eGFR<15 ml/min): 16,5-33,0
Sérové kalcium (mmol/l)	2,1-2,55
korigované na s-albumin	
Sérový fosfát (mmol/l)	CKD st.3-4: 0,87-1,49
	CKD st.5-5D: 1,13-1,78
Ca x P součin (mmol²/l²)	<4,4
Limit příjmu kalcia (mg/den)	<1500 z Ca-obsahujících fosfátových vazačů
	<2000 z Ca-obsahujících fosfátových vazačů a diety
25(OH)vitamin D (nmol/l)	>30

Modulace hladin FGF23 by mohla snížit KV riziko. Toho je možné dosáhnout redukcí příjmu fosforu, fosfátovými vazači, podáváním cinacalcetu a transplantací ledviny (184). Studie na zvířatech ukázaly příznivé účinky podávání Klotho u CKD, zatímco podávání protilátek anti-FGF23 sice zlepšilo biochemické parametry, ale zhoršilo cévní kalcifikace a mortalitu (417). Duální intervence (900 mg fosfátů v dietě + lantan) u CKD 3-4 snížila hladiny FGF23 (200). FGF23 protilátky u potkanů zmírnily progresi sekundární hyperparatyreózy, ale za cenu vývoje hyperfosfatémie, progresu cévních kalcifikací a předčasného úmrtí (184). N-3 mastné kyseliny (EPA a DHA) mohou snižovat KV riziko. Průřezová studie sledovala 619 pacientů po renální transplantaci, kteří konzumovali průměrně 15 g ryb a 139 mg EPA-DHA/den. Vyšší příjem EPA-DHA a ryb byl spojen s nižšími hladinami FGF23 (198). Ve zvířecím modelu ESRD byla mortalita při vysokofosfátové dietě 71,4%, u zvířat zároveň léčených sevelamerem 37,5% a při

současné restrikcí fosfátů jen 5,9%. Omezení fosfátů v dietě vedlo ke snížení hladin PTH, FGF23 a obsahu kalcia v aortě. Potkani užívající sevelamer měli méně glomerulosklerózy, zánětu, méně fibrózy v LK a menší kardiomyocyty (418). Fosfor je hlavním faktorem FGF23 sekrece. Studie u CKD nemocných, léčených různými fosfátovými vazacími ukázala snížení sérového i močového fosfátu, zmírnění progresu sekundární hyperparatyreózy, ale progresi cévních kalcifikací (419).

Kalcimimetika (cinakalcet) ve zvířecím modelu zmírnila kalcifikaci médií a proliferaci VSMC. Podávání cinakalcetu HD nemocným vedlo ke snížení sérového PTH, kalcia a fosfátů, ale nesnížilo KV riziko (EVOLVE) (243).

Nativní vitamin D i jeho analogy (VDRA) jsou účinná v léčbě sekundární hyperparatyreózy. I farmakologické dávky však mohou vést k vývoji hyperkalcémie, hyperfosfatémie nebo adynamické kostní choroby, které predisponují k vývoji cévních kalcifikací (VC). Novější VDRA, např. paricalcitol, mají menší riziko hyperkalcémie a hyperfosfatémie.

Pyrofosfát (PPi) je inhibítozem kalcifikace v arteriální médiu, účinkuje cestou přímé chemickofyzikální inhibice vzniku krystalů hydroxyapatitu. Jeho intravenózní podání je ale problematické díky krátkému poločasu a komplikacím, jako je kožní nekróza (420). Hemodialyzovaní (HD) pacienti mají nízké hladiny PPi a možnou cestou podání by mohla být aplikace PPi do peritoneální dutiny.

Použití antioxidantů v prevenci chorob je kontroverzní. Velká prospektivní randomizovaná studie u obecné populace neprokázala benefit suplementace vitaminem E na KV prognózu (421). Metaanalýza u osob užívajících antioxidační suplementy (vitamin A, beta karoten a vitamin E) ukázala sníženou mortalitu u skupiny se zvýšeným rizikem, ale zvýšenou mortalitu u skupiny s nízkým rizikem (422). Studie u nemocných s ICHS léčených kombinací anti-oxidantů a simvastatinu s niacinem neprokázala pozitivní efekt (423). Suplementace PUFAs působí kardioprotektivně proti ischemicko-reperfučnímu (IR) poškození, což je spojeno s posílením antioxidační ochrany. Experimentální i klinická data ukazují, že n-3 mastné kyseliny s dlouhým řetězcem mohou chránit před náhlou smrtí (424, 425). Resveratrol (trans-3,5,4'-Trihydroxystilben) je polyfenol s antioxidačními účinky in vivo. Preklinické studie ukazují také na jeho antihypertenzní účinky (127). Červené krvinky obsahují množství antioxidantů, zvýšený počet erytrocytů tak zvyšuje antioxidační kapacitu. Naopak intravenózní aplikace železa i terapie ESA může přechodně OS zvyšovat (426). Klinické randomizované studie s antioxidanty, protizánětlivými léky (např. aspirin), statiny (ovlivňují aktivitu NADPH), inhibitory RAAS jsou potřeba k vytvoření doporučení pro klinickou praxi.

Režimová opatření k redukci sérového cholesterolu mají malý efekt a neovlivňují prognózu nemocných. Doporučuje se tedy farmakologická intervence, která může snižovat KV mortalitu i nezávisle na hypolipidemickém účinku. U režimů obsahujících statin (±ezetimib) bylo ukázáno, že snižují riziko KV příhod u CKD populace, jsou tedy doporučovány nemocným s vyšším koronárním rizikem. U CKD nemocných snížil atorvastatin hladinu cholesterolu, oxLDL a hsCRP více než ezetimib (427). Index reaktivní hyperémie (index endoteliální funkce) byl vyšší u atorvastatinu. Atorvastatin je zřejmě účinnější než ezetimib ve zlepšení sérové lipidémie, v redukci oxidačního stresu, zánětu a zachování endoteliální funkce. U ESRD nebyl benefit statinů prokázán, ale u časnějších stádií CKD je jejich použití zřejmě efektivní v prevenci rizika spojeného s aterosklerózou (132).

Současná léčebná strategie u CKD dále zahrnuje podávání aspirinu nemocným s koronárním postižením diuretika, preparáty železa a dietní opatření (428). Aktuálním trendem je časné zahájení dialýzy (při eGFR 10-12 ml/min), jako prevence vývoje urémie, tato teze však není dostatečně podložena. Naopak možné škodlivé účinky časného zahájení dialýzy, např. ztráta reziduální renální funkce (RRF), byly dobře dokumentovány. Rychlost ztráty RRF („renal function trajectory“) je důležitým parametrem při rozhodnutí o zahájení dialýzy (429).

Moderní technologie (kardioprotektivní dialýza, hemofiltrace a hemodiafiltrace) jsou spojeny s menší incidencí hypotenze a arytmií, lepší clearance β 2M a fosfátů, se snížením zánětu a oxidačního stresu, snížením počtu hospitalizací (273). K prevenci zánětu se nedoporučuje používání dočasných dialyzačních katetrů. K redukci oxidačního stresu byly zavedeny speciální dialyzační techniky, jako jsou vitamínem E modifikované membrány a hemolipodialýza (430). Hemolipodialýza využívá liposomy obsahující vitamín E, které mohou samy být oxidovány, čímž vychytávají ROS. Vyšší dávka dialýzy (každodenní nebo dlouhá dialýza) se pojí s nižším LVMI, nižší fosfatémií a FGF23 a vyšším 25OH-D3 (431, 432).

CKD je spojena s vysokou prevalencí HLK, myokardiální fibrózy, prořidnutí kapilární sítě a cévními kalcifikacemi. Tyto abnormality predisponují k městnavému srdečnímu selhání a k náhlé srdeční smrti, hlavně na základě elektrické instability. Mnoho léčebných postupů selhalo v ovlivnění HLK, cévních kalcifikací nebo přežití nemocných s CKD. Zklamání přinesly studie s vitamínem D (PRIMO), kalcimimetiky (EVOLVE), bezkalciovými fosfátovými vazači. Slibnější výsledky přinesly ARB a β blokátor carvedilol (407). Některé tradiční KV rizikové faktory (hyperlipidémie, hypertenze a obezita), jsou u HD pacientů paradoxně spojeny s lepší prognózou. Netradiční rizikové faktory, jako je zánět a minerálová a kostní dysbalance, jsou zřejmě hlavními viníky vysoké mortality u CKD. Úkolem pro budoucí výzkum je objasnit patofyziologii vývoje

HLK a myokardiální fibrózy u CKD a zjistit, zda tyto poruchy mohou být reverzibilní, případně jak jim zabránit prevencí.

FGF23 je zřejmě spojovacím článkem mezi minerálovou dysbalancí HLK a KV mortalitou u CKD (174). Zvýšené hladiny FGF23 jsou u CKD zřejmě (mal-)adaptačním kompenzatorním mechanismem. Je třeba definovat optimální hladiny FGF23 v séru. Léčba protilátkami proti FGF23 ve zvířecím modelu CKD spíše zvyšovala mortalitu (184).

Fascinujícím objevem bylo poznání, že srdeční funkci z velké části ovlivňují mikro-RNAs, které jsou zodpovědné za transkripci RNA. Dvě specifické mikro-RNAs (miR-1 a miR-133) jsou spojeny s arytmiemi a jiné (miR-21 a miR-29) s kardiální fibrózou (434). Po zátěži sodíkem se při normální renální funkci vyplavují kardiotonické steroidy (ouabain, marinobufagenin). Tyto látky vyvolávají poruchy typické pro uremickou kardiomyopatii a neutralizující protilátky podobným lézím zabrání (82, 83).

Ačkoliv bylo již mnoho dokázáno, je stále třeba zlepšovat životy a duševní pohodu našich nemocných. Prioritou budoucího výzkumu by mělo být náhlé úmrtí, neboť v této oblasti lze očekávat největší benefit pro pacienty.

6. ZÁVĚRY

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

- a) Anamnéza KV chorob nezávisle a nejtěsněji korelovala s věkem ($r=0,57$), s koncentrací FGF23 ($r=0,43$) a inverzně s hladinou triacylglycerolů ($r= -0,37$), $p<0,05$ pro všechny uvedené parametry.
- b) Hladiny FGF23 ($r=0,3$ $p<0,01$), PAPP-A ($r=0,35$, $p<0,001$) a PTH ($r=0,3$, $p<0,005$) nezávisle korelovaly s věkem, zatímco hladina kalcitriolu inverzně korelovala s věkem ($r=-0,4$, $p<0,002$).
- c) Hladina FGF23 nezávisle korelovala s hladinou MMP-2 ($r= 0,42$. $p< 0,0001$)
- d) Hladina FGF23 nezávisle korelovala s PTH a inverzně s hladinou kalcitriolu ($p<0,01$ oba)
- e) Hladina MMP-2 nezávisle korelovala s fosfatémií ($p<0,01$).

Naše data tedy potvrzují vstupní hypotézu, že existuje nezávislá korelace hladin FGF23 s hladinami MMP-2, kalcitriolu a PTH a dále že nemocní s anamnézou KV chorob mají vyšší hladiny FGF23.

Budoucí studie by se měly zaměřit na možnou kauzalitu vztahu FGF23 a MMP-2 a zjistit, zda kontrola příjmu fosfátů a podávání VDRAs může ovlivnit hladiny MMPs a FGF23 a snížit KV

riziko CKD nemocných. Je třeba zjistit, zda snížení zátěže fosfáty povede k poklesu hladiny FGF23 a zvýšení produkce kalcitriolu, s možným pozitivním efektem na sekundární hyperparatyreózu a kardiovaskulární morbiditu.

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

a) Během sledovaného období jsme zaznamenali následující změny (vstupní nálezy vs. finální nálezy po 36±10 měsících):

-zvýšený LVMI u 29% vs. 37,1% nemocných

-abnormální LV geometrii u 43,5% vs. 56,5%

-abnormální diastolickou funkci LK u 74,1% vs. 75,8% nemocných.

Tyto trendy však nebyly statisticky signifikantní.

b) LVMI nezávisle korelovalo s hladinami PIGF, BNP, systolickým TK a funkcí ledvin

c) Diastolická funkce LK nezávisle korelovala s hladinami EN-RAGE a funkcí ledvin

d) Během sledovaného období jsme spolu se snižující se funkcí ledvin (eGFR) zaznamenali zvýšení LVMI, rozměru levé síně, EN-RAGE, FGF23 a BNP

e) Během sledovaného období jsme spolu se snižující se eGFR zaznamenali snížení EFLK, hladiny albuminémie, hladiny vitamínu D a hemoglobinu.

Naše data tedy potvrzují vstupní hypotézu, že PIGF nezávisle koreluje s LVMI u nemocných s CKD 2-4. Nebyla zjištěna korelace PIGF s tradičními rizikovými faktory. Diastolická funkce LK nezávisle korelovala s hladinami EN-RAGE.

Další výzkum je nezbytný k ozřejmění takové strategie, která by dokázala zachovat kardiální strukturu a funkci. Mezi tradičními a netradičními rizikovými faktory je nyní třeba nalézt ty, které mohou být modifikovány a na které může cílit léčba. Výzkum by se měl zaměřit na antagonizování FGF23 a klinické výstupy této léčby u CKD.

7. LITERATURA

1. Waldum B, Os I. The cardiorenal syndrome: what the cardiologist needs to know. *Cardiology*. 2013;126(3):175-86.
2. Stenvinkel P, Larsson TE. Chronic kidney disease: a clinical model of premature aging. *Am J Kidney Dis*. 2013 Aug;62(2):339-51
3. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY: Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 351: 1296–1305, 2004
4. Anavekar NS, McMurray JJV, Velazquez EJ, Solomon SD, Kober L, Rouleau JL, White HD, Nordlander R, Maggioni A, Pfeffer MA: Relation between renal dysfunction and cardiovascular outcomes after myocardial infarction. *N Engl J Med* 351: 1285–1295, 2004
5. Keith DS, Nichols GA, Guillon CM, Brown JB, Smith DH: Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch Intern Med* 164: 659–663, 2004
6. Meier P, Vogt P, Blanc E: Ventricular arrhythmias and sudden cardiac death in end-stage renal disease patients on chronic hemodialysis. *Nephron* 87: 199–214, 2001
7. Aoki J, Nakajima H, Mori M: Clinical and pathologic characteristics of dilated cardiomyopathy in hemodialysis patients. *Kidney Int* 67: 333–341, 2005
8. Sarnak MJ¹, Levey AS. Cardiovascular disease and chronic renal disease: a new paradigm. *Am J Kidney Dis*. 2000 Apr;35(4 Suppl 1):S117-31.
9. Hatamizadeh P, Fonarow GC, Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K.:Cardiorenal syndrome: pathophysiology and potential targets for clinical management. *Nat Rev Nephrol*. 2013 Feb;9(2):99-111.
10. Goh CY¹, Vizzi G, De Cal M, Ronco C. Cardiorenal syndrome: a complex series of combined heart/kidney disorders. *Contrib Nephrol*. 2011;174:33-45. doi: 10.1159/000329233.
11. Mutluay R, Konca C, Erten Y, Pasaoglu H, Deger SM, Agirgun C, Derici U, Arinsoy T, Sindel S. Predictive markers of asymptomatic atherosclerosis in end-stage renal disease patients. *Ren Fail*. 2010;32:448–454.
12. Arikan H, Koc M, Tuglular S, Ozener C, Akoglu E. Elevated plasma levels of PAI-1 predict cardiovascular events and cardiovascular mortality in prevalent peritoneal dialysis patients. *Ren Fail*. 2009;31:438–445.
13. Ritz E¹, Bommer J. Cardiovascular problems on hemodialysis: current deficits and potential improvement. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 Dec;4 Suppl 1:S71-8. doi: 10.2215/CJN.01960309.
14. deFilippi C, Wasserman S, Rosanio S, Tibliler E, Sperger H, Tocchi M, Christenson R, Uretsky B, Smiley M, Gold J, Muniz H, Badalamenti J, Herzog C, Henrich W: Cardiac troponin T and C-reactive protein for predicting prognosis, coronary atherosclerosis, and cardiomyopathy in patients undergoing long-term hemodialysis. *JAMA* 290: 353–359, 2003
15. London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2003;18(9):1731–1740.
16. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circulation Research*. 2011;109(6):697–711.
17. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, et al. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *The New England Journal of Medicine*. 2000;342(20):1478–1483. (PubMed]
18. Adeniyi KL, Siscovick DS, Ix JH, et al. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2009;20(2):381–387.
19. 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
20. Hruska K, Mathew S, Lund R, Fang Y, Sugatani T. Cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: does phosphate qualify? *Kidney international*. 2011;79(supplement 121):S9–S13.
21. Jono S, McKee MD, Murry CE, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation Research*. 2000;87(7)

22. Li X, Yang H-Y, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation Research*. 2006;98(7):905–912.
23. Speer MY, Yang H-Y, Brabb T, et al. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circulation Research*. 2009;104(6):733–741.
24. Villa-Bellosta R, Bogaert YE, Levi M, Sorribas V. Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells: implications for vascular calcification. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27(5):1030–1036
25. Tang Z, Wang A, Yuan F, Yan Z, Liu B, Chu JS, Helms JA, Li S. Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases. *Nat Commun*. 2012 Jun 6;3:875.
26. Nemcsik J¹, Kiss I, Tislér A. Arterial stiffness, vascular calcification and bone metabolism in chronic kidney disease. *World J Nephrol*. 2012 Feb 6;1(1):25-34. doi: 10.5527/wjn.v1.i1.25.
27. Louvet L¹, Büchel J, Steppan S, Passlick-Deetjen J, Massy ZA. Magnesium prevents phosphate-induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Apr;28(4):869-78.
28. Guilgen G¹, Werneck ML, de Noronha L, Martins AP, Varela AM, Nakao LS, Pecoits-Filho R. Increased calcification and protein nitration in arteries of chronic kidney disease patients. *Blood Purif*. 2011;32(4):296-302.
29. Calvo MS, Uribarri J. Public health impact of dietary phosphorus excess on bone and cardiovascular health in the general population. *Am J Clin Nutr*. 2013 Jul;98(1):6-15.
30. Vervloet MG¹, Massy ZA², Ureña-Torres P⁶, Bover J⁷, Goldsmith D⁸; 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.
31. Maser RE, Lenhard MJ, Sneider MB, Pohlig RT. Osteoprotegerin is a Better Serum Biomarker of Coronary Artery Calcification Scores than Osteocalcin in Type 2 Diabetes. *Endocr Pract*. 2014 Aug 6:1-28.
32. Kim KJ, Kim KM, Park KH, Choi HS, Kim MJ, Oh SM, Brown JK, Lim SK. Aortic calcification and bone metabolism: the relationship between aortic calcification, BMD, vertebral fracture, 25-hydroxyvitamin D, and osteocalcin. *Calcif Tissue Int*. 2012 Dec;91(6):370-8
33. Register TC, Divers J, Bowden DW, Carr JJ, Hruska KA, Langefeld CD, Freedman BI. Relationships between serum adiponectin and bone density, adiposity and calcified atherosclerotic plaque in the African American-Diabetes Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 May;98(5):1916-22.
34. Liu GY, Liang QH, Cui RR, Liu Y, Wu SS, Shan PF, Yuan LQ, Liao EY. Leptin promotes the osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells from female mice by increasing RANKL expression. *Endocrinology*. 2014 Feb;155(2):558-67.
35. Kristanto W, van Ooijen PM, Groen JM, Vliegenthart R, Oudkerk M. Small calcified coronary atherosclerotic plaque simulation model: minimal size and attenuation detectable by 64-MDCT and MicroCT. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2012 Apr;28(4):843-53.
36. Boutouyrie P, Fliser D, Goldsmith D, Covic A, Wiecek A, Lindholm B, Massy ZA, Suleymanlar G, Zoccali C, London GM. Assessment of arterial stiffness for clinical and epidemiological studies: methodological considerations for validation and entry into the European Renal and Cardiovascular Medicine registry. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Feb;29(2):232-9.
37. Frostegård J. Immune mechanisms in atherosclerosis, especially in diabetes type 2. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013 Oct 29;4:162.
38. 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
39. Park M¹, Hsu CY, Li Y, Mishra RK, Keane M, Anderson A, Go AS, Shlipak MG; Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Group. Associations between kidney function and subclinical cardiac abnormalities in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2012 Oct;23(10):1725-34
40. London GM. Left ventricular hypertrophy: why does it happen? *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Nov;18 Suppl 8
41. Buono F, Crispo S, Pagano G, Rengo G, Petitto M, Grieco F, Trimarco B, Morisco C. Determinants of left ventricular hypertrophy in patients with recent diagnosis of essential hypertension. *J Hypertens*. 2014 Jan;32(1):166-73.
42. Stel VS, Ioannou K, Brück K, Dounousi E, Zoccali C, Jager KJ, Tsakiris D. Longitudinal association of body mass index and waist circumference with left ventricular mass in hypertensive predialysis chronic

- kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Nov;28 Suppl 4:iv136-45.
43. Cordeiro AC¹, Lindholm B, Sousa MG, Grimaldi W Jr, Amparo FC, Amodeo C, Carrero JJ. Reliability of electrocardiographic surrogates of left ventricular mass in patients with chronic kidney disease. *J Hypertens*. 2014 Feb;32(2):439-45.
 44. Mishra RK¹, Li Y, DeFilippi C, Fischer MJ, Rafey M, Raj DS, Go AS, Shlipak MG; CRIC Study Investigators. Association of cardiac troponin T with left ventricular structure and function in CKD. *Am J Kidney Dis*. 2013 May;61(5):701-9.
 45. 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.
 46. Akin F, Ayça B, Köse N, Celik O, Yilmaz Y, Akin MN, Covic A, Kanbay M. Serum vitamin D and C-reactive protein levels are independently associated with diastolic dysfunction. *J Investig Med*. 2014 Jan;62(1):43-8.
 47. Haruyama N¹, Tsuchimoto A¹, Masutani K¹, Nagata M¹, Tsuruya K³, Kitazono T¹. Subclinical nephrosclerosis is linked to left ventricular hypertrophy independent of classical atherogenic factors. *Hypertens Res*. 2014 May;37(5):472-7
 48. Poulidakos D¹, Ross L, Recio-Mayoral A, Cole D, Andoh J, Carlos Kaski J, Banerjee D. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2014 Jan;15(1):56-61.
 49. Bonato FO¹, Lemos MM, Cassiolato JL, Canziani ME. Prevalence of ventricular arrhythmia and its associated factors in nondialyzed chronic kidney disease patients. *PLoS One*. 2013 Jun 7;8(6)
 50. Zoccali C, Benedetto FA, Mallamaci F, Tripepi G, Giaccone G, Cataliotti A, Seminara G, Stancanelli B, Malatino LS: Prognostic value of echocardiographic indicators of left ventricular systolic function in asymptomatic dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 15: 1029–1037, 2004
 51. Ritz E, Wanner C: : The challenge of sudden death in dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: 920–929, 2008
 52. Salvetti M, Muiesan ML, Piani A, Monteduro C, Bonzi B, Galbassini G, Belotti E, Movilli E, Cancarini G, Agabiti-Rosei E: Myocardial ultrasound tissue characterization in patients with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 18: 1953–1958, 2007
 53. Piecha G, Koleganova N, Gross ML, Geldyev A, Ritz E: Oxidative stress after uninephrectomy alters heart morphology in the apolipoprotein E ^{-/-} mouse. *J Hypertens* 26: 2220–2229, 2008
 54. Gross ML, Ritz E: Hypertrophy and fibrosis in the cardiomyopathy of uremia: Beyond coronary heart disease. *Semin Dial* 21: 308–318, 2008
 55. Herzog CA. Cardiac arrest in dialysis patients: Approaches to alter an abysmal outcome. *Kidney Int Suppl* (84): S197–S200, 2003
 56. Myerburg RJ, Castellanos A: Emerging paradigms of the epidemiology and demographics of sudden cardiac arrest. *Heart Rhythm* 3: 235–239, 2006
 57. Wanner C, Krane V, März W, Olschewski M, Mann JF, Ruf G, Ritz E: German Diabetes and Dialysis Study Investigators: Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 353: 238–248,
 58. Paoletti E, Bellino D, Gallina AM, Amidone M, 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.
 59. Mark PB, Johnston N, Groenning BA, Foster JE, Blyth KG, Martin TN, Steedman T, Dargie HJ, Jardine AG: Redefinition of uremic cardiomyopathy by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging. *Kidney Int* 69: 1839–1845, 2006
 60. Gross ML, Ritz E: Hypertrophy and fibrosis in the cardiomyopathy of uremia: Beyond coronary heart disease. *Semin Dial* 21: 308–318, 2008
 61. Herzog CA, Ma JZ, Collins AJ: Poor long-term survival after acute myocardial infarction among patients on long-term dialysis. *N Engl J Med* 339: 799–805, 1998
 62. Ritz E, Wiecek A, Gnasso A, Augustin J: Is atherogenesis accelerated in uremia? *Contrib Nephrol* 52: 1–9, 1986
 63. Halley CM¹, Houghtaling PL, Khalil MK, Thomas JD, Jaber WA. Mortality rate in patients with diastolic dysfunction and normal systolic function. *Arch Intern Med*. 2011 Jun 27;171(12):1082-7.
 64. Lee WH, Hsu PC, Chu CY, Chen SC, Su HM, Lin TH, Lee CS, Yen HW, Voon WC, Lai WT, Sheu

- SH. Associations of pulse pressure index with left ventricular filling pressure and diastolic dysfunction in patients with chronic kidney disease. *Am J Hypertens*. 2014 Mar;27(3):454-9
65. Paoletti E, Zoccali C. A look at the upper heart chamber: the left atrium in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Nov 27.
66. Onusko E, "Diagnosing secondary hypertension," *The American Family Physician*, vol. 67, no. 1, pp. 67–74, 2003.
67. DeFronzo RA, Ferrannini E, "Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease," *Diabetes Care*, vol. 14, no. 3, pp. 173–194, 1991.
68. Chrissobolis S, Miller AA, Drummond GR, Kemp-Harper BK, Sobey CG, "Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease," *Frontiers in Bioscience*, vol. 16, no. 5, pp. 1733–1745, 2011.
69. Verma S, Wang C, Li S. et al., "A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis," *Circulation*, vol. 106, no. 8, pp. 913–919, 2002.
70. Yan G, You B, Chen S, Liao JK, Sun J, "Tumor necrosis factor- α downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1- α 1," *Circulation Research*, vol. 103, no. 6, pp. 591–597, 2008.
71. Ballou SP, Lozanski G, "Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein," *Cytokine*, vol. 4, no. 5, pp. 361–368, 1992.
72. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ETH, "Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells," *Circulation*, vol. 102, no. 18, pp. 2165–2168, 2000.
73. Kubes P, Suzuki M, Granger DN, "Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 11, pp. 4651–4655, 1991.
74. Touyz RM, "Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells—implications in cardiovascular disease," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 37, no. 8, pp. 1263–1273, 2004.
75. Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martísek P et al., "Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 16, pp. 9220–9225, 1998.
76. Chen X¹, Mori T, Guo Q, Hu C, Ohsaki Y, Yoneki Y, Ogawa S, Nakayama M, Miyata T, Ito S. Carbonyl stress induces hypertension and cardio-renal vascular injury in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res*. 2013 Apr;36(4):361-7.
77. Mori T, Ogawa S, Cowley AW Jr, Ito S. Role of renal medullary oxidative and/or carbonyl stress in salt-sensitive hypertension and diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012 Jan;39(1):125-31
78. de Wardener HE, He FJ, MacGregor GA: Plasma sodium and hypertension. *Kidney Int* 66: 2454–2466, 2004
79. Huang BS, Amin MS, Leenen FH: The central role of the brain in salt-sensitive hypertension. *Curr Opin Cardiol* 21: 295–304, 2006
80. Matavelli LC, Zhou X, Varagic J, Susic D, Frohlich ED: Salt loading produces severe renal hemodynamic dysfunction independent of arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H814–H819, 2007
81. Schoner W, Scheiner-Bobis G: Role of endogenous cardiotonic steroids in sodium homeostasis. *Nephrol Dial Transplant* 23: 2723–2729, 2008
82. Kennedy DJ, Vetteth S, Periyasamy SM, Kanj M, Fedorova L, Malhotra D, Kolodkin NI, Lakatta EG, Fedorova OV, Bagrov AY, Shapiro JI: Central role of the cardiotonic steroid marinobufagenin in the pathogenesis of experimental uremic cardiomyopathy. *Hypertension* 47: 488–495, 2006
83. Stella P, Manunta P, Mallamaci F, Melandri M, Spotti D, Tripepi G, Bianchi G, Zoccali C: Endogenous ouabain and cardiomyopathy in dialysis patients. *J Intern Med* 263: 274–280, 2008
84. Ferrari P, Ferrandi M, Valentini G, Bianchi G: Rostafuroxin: An ouabain antagonist that corrects renal and vascular Na⁺-K⁺-ATPase alterations in ouabain and adducin-dependent hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R529–R535, 2006
85. Wenceslau CF¹, Rossoni LV. Rostafuroxin ameliorates endothelial dysfunction and oxidative stress in resistance arteries from deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: the role of Na⁺K⁺-ATPase/ cSRC

- pathway. *J Hypertens*. 2014 Mar;32(3):542-54.
86. Weber K: Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med* 348: 1689, 2001
 87. McGraw AP¹, Bagley J, Chen WS, Galayda C, Nickerson H, Armani A, Caprio M, Carmeliet P, Jaffe IZ. Aldosterone increases early atherosclerosis and promotes plaque inflammation through a placental growth factor-dependent mechanism. *J Am Heart Assoc*. 2013 Feb 22;2(1)
 88. Wu SY, et al. Endogenous aldosterone is involved in vascular calcification in rat. *Exp Biol Med* (Maywood). 2012;237(1):31–37.
 89. Boesby L, Elung-Jensen T, Kamper AL. Eplerenone attenuates pulse wave reflection in chronic kidney disease stage 3-4--a randomized controlled study. *PLoS One*. 2013 May 21;8(5):
 90. 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
 91. 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
 92. Morishita Y, et al. Long-term effects of aliskiren on blood pressure and the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive hemodialysis patients. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2012;5:45–51.
 93. Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A. Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis. *Diabetologia*. 1989;32(4):219–226
 94. Hellemons ME, Lambers Heerspink HJ, Gansevoort RT, de Zeeuw D, Bakker SJ. High-sensitivity troponin T predicts worsening of albuminuria in hypertension; results of a nested case-control study with confirmation in diabetes. *J Hypertens*. 2013;31(4):805–812.
 95. Tsioufis C, Dimitriadis K, Chatzis D, et al. Relation of microalbuminuria to adiponectin and augmented C-reactive protein levels in men with essential hypertension. *Am J Cardiol*. 2005;96(7):946–951
 96. Agrawal V, Marinescu V, Agarwal M, McCullough PA. Cardiovascular implications of proteinuria: an indicator of chronic kidney disease. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(4):301–311.
 97. Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M, et al. ADMA levels correlate with proteinuria, secondary amyloidosis, and endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(2):388–395.
 98. Zhu X, Wu S, Dahut WL, Parikh CR. Risks of proteinuria and hypertension with bevacizumab, an antibody against vascular endothelial growth factor: systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2007;49(2):186–193.
 99. Pedrinelli R, Giampietro O, Carmassi F, et al. Microalbuminuria and endothelial dysfunction in essential hypertension. *Lancet*. 1994;344(8914):14–18.
 100. Stehouwer CD, Gall MA, Twisk JW, Parving HH. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. *Diabetes*. 2002;51(4):1157–1165.
 101. Mykkänen L, Zaccaro DJ, Wagenknecht LE, Robbins DC, Gabriel M, Haffner SM. Microalbuminuria is associated with insulin resistance in nondiabetic subjects: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*. 1998;47(5):793–800.
 102. Ohsawa M, Fujioka T, Ogasawara K, Itai K, Ogawa A. High risks of all-cause and cardiovascular deaths in apparently healthy middle-aged people with preserved glomerular filtration rate and albuminuria: A prospective cohort study. *Int J Cardiol*. 2013 Dec 10;170(2):167-72
 103. Sjöblom P¹, Nystrom FH², Länne T³, Engvall J⁴, Östgren CJ³. Microalbuminuria, but not reduced eGFR, is associated with cardiovascular subclinical organ damage in type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2014 Feb;40(1):49-55.
 104. Breyer JA, Bain RP, Evans JK, Nahman NS Jr, Lewis EJ, Cooper M, McGill J, Berl T: Predictors of the progression of renal insufficiency in patients with insulin-dependent diabetes and overt diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *Kidney Int* 50: 1651–1658, 1996
 105. Ruggenenti P, Perna A, Mosconi L, Pisoni R, Remuzzi G: Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. “Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia” (GISEN). *Kidney Int* 53: 1209–1216, 1998
 106. de Zeeuw D, Remuzzi G, Parving HH, Keane WF, Zhang Z, Shahinfar S, Snapinn S, Cooper ME, Mitch WE, Brenner BM: Proteinuria, a target for renoprotection in patients with type 2 diabetic nephropathy: Lessons from RENAAL. *Kidney Int* 65: 2309–2320, 2004

107. Wachtell K, Ibsen H, Olsen MH, Devereux RB, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Snapinn SM, Aurup P: Albuminuria and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: The LIFE study. *Ann Intern Med* 139: 901–906, 2003
108. Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, Halle JP, Young J, Rashkow A, Joyce C, Nawaz S, Yusuf S; HOPE Study Investigators: Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA* 286: 421–426, 2001
109. Kannel WB, Stampfer MJ, Castelli WP, Verter J: The prognostic significance of proteinuria: The Framingham study. *Am Heart J* 108: 1347–1352, 1984
110. Zhou G, Cheung AK, Liu X, Huang Y. Valsartan slows the progression of diabetic nephropathy in db/db mice via a reduction in podocyte injury, and renal oxidative stress and inflammation. *Clin Sci (Lond)*. 2014 May;126(10):707-20
111. Spoto B, Mattace-Raso F, Sijbrands E, Pizzini P, Cutrupi S, D'Arrigo G, Tripepi G, Zoccali C, Mallamaci F. Resistin and all-cause and cardiovascular mortality: effect modification by adiponectin in end-stage kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Nov;28 Suppl 4:iv181-7.
112. Ruster C, Wolf G. Adipokines promote chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Nov;28 Suppl 4:iv8-14.
113. 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.
114. Cabezas-Rodriguez I¹, Carrero JJ, Zoccali C, Qureshi AR, Ketteler M, Floege J, London G, Locatelli F, Influence of body mass index on the association of weight changes with mortality in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013 Oct;8(10):1725-33.
115. Iff S, Wong G, Webster AC, Flood V, Wang JJ, Mitchell P, Craig JC. Relative energy balance, CKD, and risk of cardiovascular and all-cause mortality. *Am J Kidney Dis*. 2014 Mar;63(3):437-45.
116. Aroor AR, McKarns S, Demarco VG, Jia G, Sowers JR. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. *Metabolism*. 2013 Nov;62(11):1543-52.
117. Aroor AR¹, Demarco VG, Jia G, Sun Z, Nistala R, Meininger GA, Sowers JR. The role of tissue Renin-Angiotensin-aldosterone system in the development of endothelial dysfunction and arterial stiffness. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013 Oct 29;4:161.
118. Forstermann U, Sessa WC: Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.*, 33 (2012), pp. 829–837 (837a-837d)
119. Melikian N, Seddon MD, Casadei B, Chowienczyk PJ, Shah AM: Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation. *Trends Cardiovasc. Med*, 19 (2009), pp. 256–262
120. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, 87 (2007), pp. 315–424
121. Togashi H, Sakuma I, Yoshioka M, Kobayashi T, Yasuda H et al. : A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 262 (1992), pp. 343–347
122. Patel RP, Hogg N, Spencer NY, Kalyanaraman B, Matalon S, Darley-Usmar VM: Biochemical characterization of human S-nitrosohemoglobin: effects on oxygen binding and transnitrosation. *J. Biol. Chem.*, 274 (1999), pp. 15487–15492
123. Thomas DD, Liu X, Lancaster JR Jr.: The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (2001), pp. 355–360
124. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R: Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, 299 (2003), pp. 896–899
125. Rapoport RM, Draznin MB, Murad F: Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*, 306 (1983), pp. 174–176
126. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Chayama K, Oshima T: Effect of obesity on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in normotensive individuals and patients with essential hypertension. *Am. J. Hypertens.*, 14 (2001), pp. 1038–1045
127. Carrizzo A, Puca A, Damato A, Marino M, Franco E, Pompeo F, Traficante A, Civitillo F, Santini L, Trimarco V, Vecchione C.: Resveratrol improves vascular function in patients with hypertension and dyslipidemia by modulating NO metabolism. *Hypertension*. 2013 Aug;62(2):359-66.
128. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemia. The Task Force for the management of dyslipidemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS) *Eur Heart J*. 2011;32:1769–818.

129. Adult Treatment Panel III. The Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *J Am Med Assoc.* 2001;285:2486–97.
130. Parks EJ, Hellerstein MK. Carbohydrate induced hypertriglyceridemia: Historical perspective and review of biological mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:412–33.
131. Mahalle N, Garg MK, Naik SS, Kulkarni MV.: Study of pattern of dyslipidemia and its correlation with cardiovascular risk factors in patients with proven coronary artery disease. *Indian J Endocrinol Metab.* 2014 Jan;18(1):48-55.
132. Massy ZA.: The role of lipids and uremic toxins in cardiovascular disease in CKD. *Clin Exp Nephrol.* 2014 Apr;18(2):255-6.
133. Liabeuf S, Glorieux G, Lenglet A, Diouf M, Schepers E, Desjardins L, Choukroun G, Vanholder R, Massy ZA; European Uremic Toxin (EUTox) Work Group.: Does p-cresylglucuronide have the same impact on mortality as other protein-bound uremic toxins? *PLoS One.* 2013 Jun 24;8(6)
134. Donfrancesco C, Palleschi S, Palmieri L, Rossi B, Lo Noce C, Pannozzo F, Spoto B, Tripepi G, Zoccali C, Giampaoli S. Estimated glomerular filtration rate, all-cause mortality and cardiovascular diseases incidence in a low risk population: the MATISS study. *PLoS One.* 2013 Oct 16;8(10)
135. Eriksen BO, Løchen ML, Arntzen KA, Bertelsen G, Toft I, Mathiesen EB. Subclinical cardiovascular disease is associated with a high glomerular filtration rate in the nondiabetic general population. *Kidney Int.* 2014 Jul;86(1):146-53
136. Keller C, Katz R, Sarnak MJ, Fried LF, Kestenbaum B, Cushman M, Shlipak MG; CHS study. Inflammatory biomarkers and decline in kidney function in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Nephrol Dial Transplant.* 2010 Jan;25(1):119-24.
137. 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
138. Covic A, Kothawala P, Bernal M, Robbins S, Chalian A, Goldsmith D.: Systematic review of the evidence underlying the association between mineral metabolism disturbances and risk of all-cause mortality, cardiovascular mortality and cardiovascular events in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2009 May;24(5):1506-23
139. Regmi P¹, Malla B², Gyawali P³, Sigdel M⁴, Shrestha R⁵, Shah DS⁶, Khanal MP⁷. Product of serum calcium and phosphorus (Ca × PO₄) as predictor of cardiovascular disease risk in predialysis patients. *Clin Biochem.* 2014 Jan;47(1-2):77-81.
140. Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, Patterson DJ, 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.
141. Lertdumrongluk P, Lau WL, Park J, Rhee CM, Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K.: Impact of age on survival predictability of bone turnover markers in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2013 Oct;28(10):2535-45
142. Young EW, Albert JM, Satayathum S, Goodkin DA, Pisoni RL, Akiba T, Akizawa T, Kurokawa K, Bommer J, Piera L, Port FK.: Predictors and consequences of altered mineral metabolism: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. *Kidney Int.* 2005 Mar;67(3):1179-87.
143. Yamada S, Tokumoto M, Tatsumoto N, Taniguchi M, Noguchi H, Nakano T, Masutani K, Ooboshi H, Tsuruya K, Kitazono T.: Phosphate overload directly induces systemic inflammation and malnutrition as well as vascular calcification in uremia. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014 Jun 15;306(12):F1418-28
144. Covic A, Rastogi A. Hyperphosphatemia in patients with ESRD: assessing the current evidence linking outcomes with treatment adherence. *BMC Nephrol.* 2013 Jul 18;14:153.
145. 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.
146. Bhuriya R, Li S, Chen S-C, McCullough PA, Bakris GL. Plasma parathyroid hormone level and prevalent cardiovascular disease in CKD stages 3 and 4: an analysis from the Kidney Early Evaluation Program (KEEP) *American Journal of Kidney Diseases.* 2009;53(4, supplement 4):S3–S10
147. Wolf M, Thadhani R. Vitamin D in patients with renal failure: a summary of observational mortality studies and steps moving forward. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2007;103(3–

5):487–490.

148. Evenepoel P, Meijers B, Viaene L, et al. Fibroblast growth factor-23 in early chronic kidney disease: additional support in favor of a phosphate-centric paradigm for the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2010;5(7):1268–1276
149. 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.
150. Gutiérrez OM. Fibroblast growth factor 23, Klotho, and disordered mineral metabolism in chronic kidney disease: unraveling the intricate tapestry of events and implications for therapy. *J Ren Nutr*. 2013 May;23(3):250–4
151. Ureña-Torres P, Prié D, Keddad K, Preston P, Wilde P, Wan H, Copley JB. Changes in fibroblast growth factor 23 levels in normophosphatemic patients with chronic kidney disease stage 3 treated with lanthanum carbonate: results of the PREFECT study, a phase 2a, double blind, randomized, placebo-controlled trial. *BMC Nephrol*. 2014 May 5;15:71
152. Pavik I, Jaeger P, Ebner L, Wagner CA, Petzold K, Spichtig D, Poster D, Wüthrich RP, Russmann S, Serra AL. Secreted Klotho and FGF23 in chronic kidney disease Stage 1 to 5: a sequence suggested from a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Feb;28(2):352–9.
153. ADHR Consortium. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nature Genetics*. 2000;26(3):345–348
154. Slatopolsky E, Caglar S, Pennell JP, Taggart DD, Canterbury JM, Reiss E, Bricker NS. On the pathogenesis of hyperparathyroidism in chronic experimental renal insufficiency in the dog. *J Clin Invest*. 1971 Mar;50(3):492–9.
155. Martin A, David V, Quarles LD (2012) Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol Rev* 92: 131–155
156. Yu X, Ibrahim OA, Goetz R, et al. Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23. *Endocrinology*. 2005;146(11):4647–4656.
157. Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2005;16(2):233–247.
158. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. 2006;444(7120):770–774
159. Kuro-O M. Phosphate and Klotho. *Kidney International*. 2011;(121):S20–S23
160. Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, et al. FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;314(2):409–414.
161. Andrukhova O, Zeitz U, Goetz R, Mohammadi M, Lanske B, Erben RG. FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2-SGK1 signaling pathway. *Bone*. 2012 Sep;51(3):621–8.)
162. Scialla JJ, Lau WL, Reilly MP, et al. Fibroblast growth factor 23 is not associated with and does not induce arterial calcification. *Kidney International*. 2013;83(6):1159–1168.
163. Donate-Correa J, Mora-Fernández C, Martínez-Sanz R. Expression of FGF23/KLOTHO system in human vascular tissue. *International Journal of Cardiology*. 2013;165(1):179–183.
164. Fang Y, Ginsberg C, Sugatani T, Monier-Faugere MC, Malluche H, Hruska KA. Early chronic kidney disease-mineral bone disorder stimulates vascular calcification. *Kidney International*. 2013
165. Lindberg K, Olauson H, Amin R, et al. Arterial klotho expression and FGF23 effects on vascular calcification and function. *PLoS ONE*. 2013;8(4)
166. Andrukhova O, Slavic S, Smorodchenko A, Shalhoub V, Lanske B, Pohl EE, Erben RG. FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. *EMBO Mol Med*. 2014 May 5;6(6):744–59.
167. Hasegawa H, Nagano N, Urakawa I, et al. Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease. *Kidney International*. 2010;78(10):975–980
168. Liu S, Tang W, Zhou J, et al. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(5):1305–1315.
169. Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, et al. Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*. 2005;289(5):F1088–F1095

170. Hansen D, Rasmussen K, Pedersen SM, Rasmussen LM, Brandi L. Changes in fibroblast growth factor 23 during treatment of secondary hyperparathyroidism with alfacalcidol or paricalcitol. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2012;27(6):2263–2269.
171. Komaba H, Fukagawa M. FGF23-parathyroid interaction: implications in chronic kidney disease. *Kidney International*. 2010;77(4):292–298.
172. Canalejo R, Canalejo A, Martinez-Moreno JM, et al. FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010;21(7):1125–1135.
173. López I, Rodríguez-Ortiz ME, Almadén Y, et al. Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Kidney International*. 2011;80(5):475–482.
174. 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.
175. Kendrick J, Cheung AK, Kaufman JS, et al. FGF-23 associates with death, cardiovascular events, and initiation of chronic dialysis. *Journal of the American Society of Nephrology*.
176. Gutiérrez OM, Januzzi JL, Isakova T, et al. Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation*. 2009;119(19):2545–2552
177. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(11):4393–4408
178. Sharma S, Joseph J, Chonchol M, Kaufman JS, Cheung AK, Rafeq Z, Smits G, Kendrick J; HOST Investigators. Higher fibroblast growth factor-23 concentrations associate with left ventricular systolic dysfunction in dialysis patients. *Clin Nephrol*. 2013 Nov;80(5):313-21
179. Kovesdy CP, Quarles LD. Fibroblast growth factor-23: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Sep;28(9):2228-36.
180. Dai B, et al. A Comparative Transcriptome analysis identifying FGF23 regulated genes in the kidney of a mouse CKD model. *PLoS One*. 2012;7(9)
181. Mitani H, et al. In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension*. 2002;39(4):838–843.
182. Simpson RU, Hershey SH, Nibelink KA. Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;103(3–5):521–524.
183. Thadhani R, et al. Vitamin D therapy and cardiac structure and function in patients with chronic kidney disease: the PRIMO randomized controlled trial. *JAMA*. 2012;307(7):674–684.
184. Shalhoub V, Shatzen 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.
185. Bernheim J, Benchetrit S.: The potential roles of FGF23 and Klotho in the prognosis of renal and cardiovascular diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Aug;26(8):2433-8.
186. 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.
187. Tsuji K, Maeda T, Kawane T, Matsunuma A, Horiuchi N: Leptin stimulates fibroblast growth factor 23 expression in bone and suppresses renal 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 synthesis in leptin-deficient mice. *J Bone Miner Res* 25: 1711–1723, 2010.
188. Bouma-de Krijger A¹, Bots ML, Vervloet MG, Blankestijn PJ, Ter Wee PW, van Zuilen AD, Wetzels JF. Time-averaged level of fibroblast growth factor-23 and clinical events in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Jan;29(1):88-97.
189. Ozkok A, Kekik C, Karahan GE, Sakaci T, Ozel A, Unsal A, Yildiz A. FGF-23 associated with the progression of coronary artery calcification in hemodialysis patients. *BMC Nephrol*. 2013 Nov 1;14:241.
190. Scialla JJ, Xie H, Rahman M, Isakova T, Grunwald JE, He J, Lash JP, Go AS, Kusek JW, Feldman H, Wolf M; Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Investigators. Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular events in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2014 Feb;25(2):349-60.
191. Xiao Y, Peng C, Huang W, Zhang J, Xia M, Zhang Y, Ling W. Circulating fibroblast growth factor 23 is associated with angiographic severity and extent of coronary artery disease. *PLoS One*. 2013 Aug 28;8(8):e72545.
192. Jimbo R, Kawakami-Mori F, Mu S, Hirohama D, Majtan B, Shimizu Y, Yatomi Y, Fukumoto S, Fujita T, Shimosawa T.: Fibroblast growth factor 23 accelerates phosphate-induced vascular calcification in the absence of Klotho deficiency. *Kidney Int*. 2014 May;85(5):1103-11.

193. Jovanovich A, Ix JH, Gottdiener J, Kestenbaum B, de Boer IH, Sarnak M, Shlipak MG, Mukamal KJ, Siscovick D, Chonchol M.: Fibroblast growth factor 23, left ventricular mass, and left ventricular hypertrophy in community-dwelling older adults. *Atherosclerosis*. 2013 Nov;231(1):114-9.
194. Ix JH, Katz R, Kestenbaum BR, Mukamal KJ, Rifkin D, Siscovick DS, Sarnak MJ, Shlipak MG.: Fibroblast growth factor-23 and death, heart failure, and cardiovascular events in community-living individuals: CHS (Cardiovascular Health Study). *J Am Coll Cardiol*. 2012 Jul 17;60(3):200-7.
195. Unsal A, Kose Budak S, Koc Y, Basturk T, Sakaci T, Ahbap E, Sinangil A.: Relationship of fibroblast growth factor 23 with left ventricle mass index and coronary calcification in chronic renal disease. *Kidney Blood Press Res*. 2012;36(1):55-64
196. Majd A, I. Mirza, Tomas Hansen, Lars Johansson, Håkan Ahlström, Anders Larsson, Lars Lind, and Tobias E. Larsson: Relationship between circulating FGF23 and total body atherosclerosis in the community. *Nephrol. Dial. Transplant*. (2009) 24 (10): 3125-3131
197. Baia LC, Humalda JK, Vervloet MG, Navis G, Bakker SJ, de Borst MH; NIGRAM Consortium.: Fibroblast growth factor 23 and cardiovascular mortality after kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013 Nov;8(11):1968-78
198. Baia LC, Van den Berg E, Vervloet MG, De Borst MH; on behalf of the NIGRAM consortium.: Fish and omega-3 fatty acid intake in relation to circulating fibroblast growth factor 23 levels in renal transplant recipients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014 Jun 23.
199. Burnett S-AM, Gunawardene SC, Bringhurst FR, Juppner H, Lee H, Finkelstein JS. Regulation of C-terminal and intact FGF-23 by dietary phosphate in men and women. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2006;21(8):1187-1196
200. 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
201. Cancela ALE, Oliveira RB, Gracioli FG, et al. Fibroblast growth factor 23 in hemodialysis patients: effects of phosphate binder, calcitriol and calcium concentration in the dialysate. *Nephron*. 2010;117(1):c74-c82.
202. Chue CD, Townend JN, Moody WE, et al. Cardiovascular effects of sevelamer in stage 3 CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013;24(5):842-852.
203. Gonzalez-Parra E, Gonzalez-Casaus ML, Galán A, et al. Lanthanum carbonate reduces FGF23 in chronic kidney disease stage 3 patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011;26(8):2567-2571
204. Martin A, et al. Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor Fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling. *FASEB J*. 2011;25(8):2551-2562.
205. Wöhrle S, et al. FGF receptors control vitamin D and phosphate homeostasis by mediating renal FGF-23 signaling and regulating FGF-23 expression in bone. *J Bone Miner Res*. 2011;26(10):2486-2497.
206. Wetmore JB, Liu S, Krebill R, Menard R, Quarles LD. Effects of cinacalcet and concurrent low-dose vitamin D on FGF23 levels in ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(1):110-116.
207. Koizumi M, Komaba H, Nakanishi S, Fujimori A, Fukagawa M. Cinacalcet treatment and serum FGF23 levels in haemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2012;27(2):784-790.
208. Ivanovski O¹, Nikolov IG, Joki N, Nguyen-Khoa T, Fukagawa M, Kamel S, Lacour B, Drüeke TB, Massy ZA. The calcimimetic R-568 retards uremia-enhanced vascular calcification and atherosclerosis in apolipoprotein E deficient (apoE^{-/-}) mice. *Atherosclerosis*. 2009 Jul;205(1):55-62.
209. Westenfeld R, Schäfer C, Krüger T, Haarmann C, Ivanovski O, Druke T, Massy ZA, Ketteler M, Floege J, Jahn-Dechent W. Fetuin-A protects against atherosclerotic calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Jun;20(6):1264-74
210. Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, et al. Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005;16(4):1115-1125.
211. Naves-Díaz M, Alvarez-Hernández D, Passlick-Deetjen J, et al. Oral active vitamin D is associated with improved survival in hemodialysis patients. *Kidney International*. 2008;74(8):1070-1078
212. Aoshima Y, Mizobuchi M, Ogata H, et al. Vitamin D receptor activators inhibit vascular smooth muscle cell mineralization induced by phosphate and TNF- α *Nephrology Dialysis Transplantation*. 27(5):1800-1806.

- 213.Zebger-Gong H, Müller D, Diercke M, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced aortic calcifications in experimental uremia: up-regulation of osteoblast markers, calcium-transporting proteins and osterix. *Journal of Hypertension*. 2011;29(2):339–348.
- 214.Drücke TB. Role of vitamin D in vascular calcification: bad guy or good guy? *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2012;27(5):1704–1707.
- 215.Wesseling-Perry K, Pereira RC, Sahney S, et al. Calcitriol and doxercalciferol are equivalent in controlling bone turnover, suppressing parathyroid hormone, and increasing fibroblast growth factor-23 in secondary hyperparathyroidism. *Kidney International*. 2011;79(1):112–119.
- 216.Bodyak N, Ayus JC, Achinger S, et al. Activated vitamin D attenuates left ventricular abnormalities induced by dietary sodium in Dahl salt-sensitive animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(43):16810–16815.
- 217.Shalhoub V, Shatzen 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
- 218.Drücke TB: Klotho, FGF23, and FGF receptors in chronic kidney disease: a yin-yang situation? *Kidney Int*. 2010 Dec;78(11):1057-60
- 219.Shigematsu T, Nakashima Y, Ohya M, Tatsuta K, Sakaguchi T, Hanba Y, Mima T, Negi S.: The management of hyperphosphatemia by lanthanum carbonate in chronic kidney disease patients. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2012;5:81-9.
- 220.Negri AL.: Fibroblast growth factor 23: associations with cardiovascular disease and mortality in chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol*. 2014 Jan;46(1):9-17.
- 221.Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T.: FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res*. 2004 Mar;19(3):429-35
- 222.Ärnlöv J, Carlsson AC, Sundström J, Ingelsson E, Larsson A, Lind L, Larsson TE.: Serum FGF23 and risk of cardiovascular events in relation to mineral metabolism and cardiovascular pathology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013 May;8(5):781-6
- 223.Faul C.: Fibroblast growth factor 23 and the heart. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012 Jul;21(4):369-75
- 224.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
- 225.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.
- 226.Li YC.Vitamin D receptor signaling in renal and cardiovascular protection. *Semin Nephrol*. 2013 Sep;33(5):433-47. doi: 10.1016/j.semnephrol.2013.07.005. Review.
- 227.Chitalia N, Ismail T, Tooth L, Boa F, Hampson G, Goldsmith D, Kaski JC, Banerjee D. Impact of vitamin D supplementation on arterial vasomotion, stiffness and endothelial biomarkers in chronic kidney disease patients. *PLoS One*. 2014 Mar 19;9(3):e91363
- 228.Silswal N, Touchberry CD, Daniel DR, McCarthy DL, Andresen J, Stubbs JR, Wacker MJ. FGF23 directly impairs endothelium-dependent vasorelaxation by increasing superoxide levels and reducing nitric oxide bioavailability. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Sep 1;307(5):E426-36.
- 229.Schöttker B, Jorde R, Peasey A, Brenner H; Consortium on Health and Ageing: Network of Cohorts in Europe and the United States. Vitamin D and mortality: meta-analysis of individual participant data from a large consortium of cohort studies from Europe and the United States.*BMJ*. 2014 Jun 17;348:g3656
- 230.Andress D.Nonclassical aspects of differential vitamin D receptor activation: implications for survival in patients with chronic kidney disease. *Drugs*. 2007;67(14):1999-2012.
- 231.Autier P¹, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med*. 2007 Sep 10;167(16):1730-7.
- 232.Cannell JJ, Hollis BW. Use of vitamin D in clinical practice. *Altern Med Rev*. 2008 Mar;13(1):6-20.
- 233.Kendrick J, Cheung AK, Kaufman JS, Greene T, Chonchol M; HOST (Homocysteinemia in Kidney and End Stage Renal Disease) Study Investigators. Associations of plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations with death and progression to maintenance dialysis in patients with advanced kidney disease.*Am J Kidney Dis*. 2012 Oct;60(4):567-75.
- 234.Tripepi G, Kollerits B, Leonardis D, Yilmaz MI, Postorino M, Fliser D, Mallamaci F, Kronenberg F, Zoccali C. Competitive Interaction Between Fibroblast Growth Factor 23 And Asymmetric Dimethyl

- Arginine in Patients With CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2014 Aug 22.
235. Meir T, Durlacher K, Pan Z, Amir G, Richards WG, Silver J, Naveh-Many T. Parathyroid hormone activates the orphan nuclear receptor Nurr1 to induce FGF23 transcription. *Kidney Int*. 2014 Jun 18.
236. Iguchi A, Watanabe Y, Iino N, Kazama JJ, Iesato H, Narita I. Serum magnesium concentration is inversely associated with fibroblast growth factor 23 in haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)*. 2014 Jun 5.
237. Rambod M, Heine GH, Seiler S, Dominic EA, Amdur RL, Fliser D, Raj DS. Association of vascular endothelial factors with cardiovascular outcome and mortality in chronic kidney disease patients: A 4-year cohort study. *Atherosclerosis*. 2014 Aug 12;236(2):360-365.
238. Panizo S¹, Barrio-Vázquez S, Fernández-Vázquez A, Valdivielso JM, Thadhani R, Cannata-Andía JB: Vitamin D receptor activation, left ventricular hypertrophy and myocardial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Nov;28(11):2735-44.
239. Mazzaferro S, Goldsmith D, Larsson TE, Massy ZA, Cozzolino M. Vitamin D metabolites and/or analogs: which D for which patient? *Curr Vasc Pharmacol*. 2014 Mar;12(2):339-49.
240. Bhan I¹, Tamez H, Thadhani R. Impact of new vitamin D data on future studies and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013 Jul;22(4):377-82.
241. Andrukhova O¹, Slavic S, Zeitz U, Riesen SC, Heppelmann MS, Ambrisko TD, Erben RG. Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice. *Mol Endocrinol*. 2014 Jan;28(1):53-64.
242. Gunta SS¹, Thadhani RI, Mak RH. The effect of vitamin D status on risk factors for cardiovascular disease. *Nat Rev Nephrol*. 2013 Jun;9(6):337-47.
243. 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.
244. Palmer SC¹, Nistor I, Craig JC, Pellegrini F, Messa P, Tonelli M, Covic A, Strippoli GF. Cinacalcet in patients with chronic kidney disease: a cumulative meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS Med*. 2013;10(4).
245. Moe SM¹, 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.
246. Rastogi A. Sevelamer revisited: pleiotropic effects on endothelial and cardiovascular risk factors in chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2013 Dec;7(6):322-42.
247. Maizel J¹, Six I, Dupont S, Secq E, Dehedin B, Barreto FC, Benchitrit J, Poirot S, Slama M, Tribouilloy C, Choukroun G, Mazière JC, Druke TB, Massy ZA. Effects of sevelamer treatment on cardiovascular abnormalities in mice with chronic renal failure. *Kidney Int*. 2013 Sep;84(3):491-500.
248. Chue CD¹, Townsend JN, Moody WE, Zehnder D, Edwards NC, Steeds RP, Ferro CJ. Cardiovascular effects of sevelamer in stage 3 CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Apr;24(5):842-52.
249. Covic A, Passlick-Deetjen J, Krocak M, de Francisco AL. A comparison of calcium acetate/magnesium carbonate and sevelamer-hydrochloride effects on fibroblast growth factor-23 and bone markers: post hoc evaluation from a controlled, randomized study. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Sep;28(9):2383-92
250. Cannata-Andía JB, Fernández-Martín JL, Locatelli F, London G, Ketteler M, Ferreira A, Covic A, Rutkowski B, Sánchez JE, Naves-Díaz M, Carrero JJ, Zoccali C. Use of phosphate-binding agents is associated with a lower risk of mortality. *Kidney Int*. 2013 Nov;84(5):998-1008
251. Adema AY¹, de Borst MH², Ter Wee PM³, Vervloet MG³, NIGRAM Consortium. Dietary and pharmacological modification of fibroblast growth factor-23 in chronic kidney disease. *J Ren Nutr*. 2014 May;24(3):143-50.
252. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, MTD., Mazur, M., Telser, J. (August 2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (1): 44–84
253. Klemm A, Voigt C, Friedrich M, Fünfstück R, Sperschneider H, Jäger EG, Stein G. Determination of erythrocyte antioxidant capacity in haemodialysis patients using electron paramagnetic resonance. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 Nov;16(11):2166-71.
254. 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.

255. Tbahriti HF, Kaddous A, Bouchenak M, Mekki K. Effect of different stages of chronic kidney disease and renal replacement therapies on oxidant-antioxidant balance in uremic patients. *Biochem Res Int*. 2013;2013:358985.
256. Tbahriti HF¹, Meknassi D, Moussaoui R, Messaoudi A, Zemour L, Kaddous A, Bouchenak M, Mekki K. Inflammatory status in chronic renal failure: The role of homocysteinemia and pro-inflammatory cytokines. *World J Nephrol*. 2013 May 6;2(2):31-7.
257. Schindler R. Causes and therapy of microinflammation in renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Aug;19 Suppl 5:V34-40. Review.
258. Henderson BC¹, Tyagi N, Ovechkin A, Kartha GK, Moshal KS, Tyagi SC. Oxidative remodeling in pressure overload induced chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2007 May;9(5):450-7.
259. Ristow M, Schmeisser K. Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose Response*. 2014 Jan 31;12(2):288-341.
260. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49:1304–1313.
261. Canaud B, Cristol JP, Morena M, Leray-Moragues H, Bosc JY, Vaussenat F. Imbalance of oxidants and antioxidants in haemodialysis patients. *Blood Purif* 1999; 17:99–106.
262. Kalousova M¹, Zima T, Tesar V, Sulková S, Fialová L. Relationship between advanced glycoxidation end products, inflammatory markers/acute-phase reactants, and some autoantibodies in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int Suppl*. 2003 May;(84):S62-4.
263. Guo C, Sun L, Chen X, Zhang D. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*. 2013 Jul 25;8(21):2003-14.
264. Singh, N., Dhalla, A.K., Seneviratne, C., Singal, P.K. (June 1995). "Oxidative stress and heart failure". *Molecular and Cellular Biochemistry* 147 (1): 77–81.
265. Sun Y, Yolitz J, Wang C, Spangler E, Zhan M, Zou S. Aging studies in *Drosophila melanogaster*. *Methods Mol Biol*. 2013;1048:77-93
266. Mezzano D, Pais EO, Aranda E, Panes O, Downey P, Ortiz M, Tagle R, González F, Quiroga T, Caceres MS, Leighton 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.
267. Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999;340:448–54.
268. Qureshi AR, Alvestrand A, Divino-Filho JC, et al. Inflammation, malnutrition, and cardiac disease as predictors of mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:S28–S36
269. Assa S, Hummel YM, Voors AA, Kuipers J, Muller Kobold AC, van Oeveren W, de Jong PE, Franssen CF. Hemodialysis-induced regional left ventricular systolic dysfunction and inflammation: a cross-sectional study. *Am J Kidney Dis*. 2014 Aug;64(2):265-73
270. Kaysen GA, Eiserich JP. The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Mar;15(3):538-48. Review.
271. Zakiyanov O, Kriha V, Vachek J, Zima T, Tesar V, Kalousova M. Placental growth factor, pregnancy-associated plasma protein-A, soluble receptor for advanced glycation end products, extracellular newly identified receptor for advanced glycation end products binding protein and high mobility group box 1 levels in patients with acute kidney injury: a cross sectional study. *BMC Nephrol*. 2013 Nov 4;14:245.
272. Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger S et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:594–600
273. Canaud B, Cristol JP, Morena M, Leray-Moragues H, Bosc JY, Vaussenat F. Imbalance of oxidants and antioxidants in haemodialysis patients. *Blood Purif* 1999; 17:99–106
274. de Zeeuw D, Akizawa T, Audhya P, Houser M, Krauth M, Wanner C, Wittes J, Wrolstad D, Chertow GM; BEACON Trial Investigators. Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease. *N Engl J Med*. 2013 Dec 26;369(26):2492-503.
275. Miyata T, Sugiyama S, Saito A, Kurokawa K. Reactive carbonyl compounds related uremic toxicity ("carbonyl stress"). *Kidney Int Suppl*. 2001 Feb;78:S25-31.
276. 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.
277. Utescu MS, Couture V, Mac-Way F, De Serres SA, Marquis K, Larivière R, Desmeules S, Lebel M, Boutouyrie P, Agharazii M. Determinants of progression of aortic stiffness in hemodialysis patients: a prospective longitudinal study. *Hypertension*. 2013 Jul;62(1):154-60
278. Avels 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
279. Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications. *Kidney Int Suppl*. 2000 Aug;76:S120-5. Review.
280. Chen X¹, Mori T, Guo Q, Hu C, Ohsaki Y, Yoneki Y, Zhu W, Jiang Y, Endo S, Nakayama K, Ogawa S, Nakayama M, Miyata T, Ito S. Carbonyl stress induces hypertension and cardio-renal vascular injury in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res*. 2013 Apr;36(4):361-7.
281. Makita Z¹, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, Friedman EA, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med*. 1991 Sep 19;325(12):836-42.
282. Mahajan N, Dhawan V. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in vascular and inflammatory diseases. *Int J Cardiol*. 2013 Oct 3;168(3):1788-94
283. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM: The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1498(2-3):99-111.
284. Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Stern DM, Schmidt AM, De Caterina R: Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* 2002, 105(7):816-822.
285. Kalousová M, Hodková M, Kazderová M, Fialová J, Tesar V, Dusilová-Sulková S, Zima T: Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *Am J Kidney Dis* 2006, 47(3):406-411.
286. Schlueter C, Hauke S, Flohr AM, Rogalla P, Bullerdiek J: Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms--a result of regulated alternative splicing? *Biochim Biophys Acta* 2003, 1630(1):1-6.
287. Santilli F, Vazzana N, Bucciarelli LG, Davi G: Soluble forms of RAGE in human diseases: clinical and therapeutical implications. *Curr Med Chem* 2009, 16(8):940-952.
288. Zoccali C. Left ventricular systolic dysfunction: a sudden killer in end-stage renal disease patients. *Hypertension*. 2010 Aug;56(2):187-8
289. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Inflammatory proteins as predictors of cardiovascular disease in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Aug;19 Suppl 5:V67-72.
290. Krajčovicová-Kudlácková M, Sebeková K, Schinzel R, Klvanová J. Advanced glycation end products and nutrition. *Physiol Res*. 2002;51(3):313-6.
291. Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, Rutledge R, Lin B, Amoscato AA, Zeh HJ, Lotze MT. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE Ligands, and their role in Cancer and Inflammation. *J Transl Med*. 2009;17:7-17
292. Yang Z, Tao T, Raftery MJ, Youssef P, Di Girolamo N, Geczy CL: Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12. *J Leukoc Biol* 2001, 69(6):986-994.
293. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM: The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001, 108(7):949-955.
294. Miranda LP, Tao T, Chernushevich I, Standing KG, Geczy CL, Alewood PF: Total chemical synthesis and chemotactic activity of human S100A12 (EN-RAGE). *FEBS Lett* 2001, 488(1-2):85-90.
295. Kessel C, Holzinger D, Foell D: Phagocyte-derived S100 proteins in autoinflammation: Putative role in pathogenesis and usefulness as biomarkers. *Clin Immunol* 2013, 147(3):229-241.
296. Gawdzik J, Mathew L, Kim G, Puri TS, Hofmann Bowman MA. Vascular remodeling and arterial calcification are directly mediated by S100A12 (EN-RAGE) in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2011;33(3):250-9
297. Yan L, Mathew L, Chellan B, Gardner B, Earley J, Puri TS, Hofmann Bowman MA. S100/Calgranulin-mediated inflammation accelerates left ventricular hypertrophy and aortic valve sclerosis in chronic kidney disease in a receptor for advanced glycation end products-dependent manner. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Jul;34(7):1399-411

298. Shiotsu Y¹, Mori Y, Nishimura M, Kosaki A. Prognostic utility of plasma S100A12 levels to establish a novel scoring system for predicting mortality in maintenance hemodialysis patients: a two-year prospective observational study in Japan. *BMC Nephrol*. 2013 Jan 16;14:16.
299. Saito T, Hojo Y, Ogoyama Y, Hirose M, Ikemoto T, Katsuki T, Shimada K, Kario K. S100A12 as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery disease. *Circ J*. 2012;76(11):2647-52.
300. Mahajan N, Malik N, Bahl A, Dhawan V: Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its inflammatory ligand EN-RAGE in non-diabetic subjects with pre-mature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2009, 207(2):597-602.
301. 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.
302. Oppermann U. Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:293-322.
303. Ergin V, Hariry RE, Karasu C. Carbonyl stress in aging process: role of vitamins and phytochemicals as redox regulators. *Aging Dis*. 2013 Oct 1;4(5):276-94
304. Rattanasompattikul M, Molnar MZ, Hatamizadeh P, Norris KC, Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K. Association of malnutrition-inflammation complex and responsiveness to erythropoiesis-stimulating agents in long-term hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Jul;28(7):1936-45
305. Kalantar Zadeh K, Ikizler TA, Block G, Avram MM, Kopple JD. Malnutrition—inflammation complex syndrome in dialysis patients: causes and consequences. *Am J Kidney Dis*. 2003;42:864–81
306. Kopple JD, Zhu X, Lew NL, Lowrie EG. Body weight for-height relationships predict mortality in maintenance hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1999;56:1136–48
307. Kopple JD, Greene T, Chumlea WC, et al. Relationship between nutritional status and the glomerular filtration rate: Results from the MDRD study. *Kidney Int*. 2000;57:1688–03
308. Levey AS, Greene T, Schluchter MD, Siebert C, Hall PM, et al. Glomerular filtration rate measurements in clinical trials. Modification of Diet in Renal Disease Study Group and the Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *J Am Soc Nephrol*. 1993 Nov;4(5):1159-71.
309. McCarthy DO. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 have differential effects on food intake and gastric emptying in fasted rats. *Res Nurs Health*. 2000;23:222–28
310. Kaysen GA, Chertow GM, Young B, Ronco C, Levin NW. Inflammation and dietary protein intake exert competing effects on serum albumin and creatinine in hemodialysis patients
311. Kalantar-Zadeh K, Kopple JD, Kamranpour N, Fogelman AM, Navab M. HDL-inflammatory index correlates with poor outcome in hemodialysis patients. *Kidney International*. 2007;72:1149–56.
312. DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Soderman DD, Palisi TM, Sullivan KA, Thomas KA: Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor.placenta growth factor heterodimer. *J Biol Chem* 1995, 270(13):7717-7723.
313. Iyer S, Leonidas DD, Swaminathan GJ, Maglione D, Battisti M, Tucci M, Persico MG, Acharya KR: The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem* 2001, 276(15):12153-12161.
314. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F et al: Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003, 9(7):936-943.
315. Yang W, Ahn H, Hinrichs M, Torry RJ, Torry DS: Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol* 2003, 60(1):53-60.
316. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L et al: Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 2002, 8(8):841-849.
317. Torry DS, Mukherjea D, Arroyo J, Torry RJ: Expression and function of placenta growth factor: implications for abnormal placentation. *J Soc Gynecol Investig* 2003, 10(4):178-188.
- Eriksson U, Alitalo K: VEGF receptor 1 stimulates stem-cell recruitment and new hope for angiogenesis therapies. *Nat Med* 2002, 8(8):775-777.
318. Desai J, Holt-Shore V, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS: Signal transduction and biological function of placenta growth factor in primary human trophoblast. *Biol Reprod* 1999, 60(4):887-892.

319. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H et al: Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001, 7(5):575-583.
320. Pipp F, Heil M, Issbrücker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, Weich H, Fernandez B, Golomb G, Carmeliet P et al: VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res* 2003, 92(4):378-385.
321. Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B et al: Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002, 8(8):831-840.
322. Parr C, Watkins G, Boulton M, Cai J, Jiang WG: Placenta growth factor is over-expressed and has prognostic value in human breast cancer. *Eur J Cancer* 2005, 41(18):2819-2827.
323. Maes C, Coenegrachts L, Stockmans I, Daci E, Luttun A, Petryk A, Gopalakrishnan R, Moermans K, Smets N, Verfaillie CM et al: Placental growth factor mediates mesenchymal cell development, cartilage turnover, and bone remodeling during fracture repair. *J Clin Invest* 2006, 116(5):1230-1242.
324. Perelman N, Selvaraj SK, Batra S, Luck LR, Erdreich-Epstein A, Coates TD, Kalra VK, Malik P: Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. *Blood* 2003, 102(4):1506-1514.
325. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Martin CJ, Murray DC, Barre PE: Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease therapy. *Kidney Int* 1995, 47(1):186-192.
326. Accornero F, Molkentin JD. Placental growth factor as a protective paracrine effector in the heart. *Trends Cardiovasc Med*. 2011 Nov;21(8):220-4.
327. Accornero F, van Berlo JH, Benard MJ, Lorenz JN, 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
328. De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp Mol Med*. 2012 Jan 31;44(1):1-9.
329. Liu X, Claus P, Wu M, Reyns G, Vanhaecke J, Verbeken E, Bogaert J, Janssens S. Placental growth factor increases regional myocardial blood flow and contractile function in chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013 Mar 15;304(6):H885-94
330. Carnevale D, Cifelli G, Lembo G. Placental growth factor regulates cardiac inflammation through the tissue inhibitor of metalloproteinases-3/TNF- α -converting enzyme axis: crucial role for adaptive cardiac remodeling during cardiac pressure overload. *Circulation*. 2011 Sep 20;124(12):1337-50.
331. Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, Bailey KR, Christiansen M, Holmes DR Jr, Virmani R, Oxvig C, Schwartz RS. Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2001 Oct 4;345(14):1022-9.
332. Boldt HB, Conover CA: Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): a local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs. *Growth Horm IGF Res* 2007, 17(1):10-18.
333. Bergmann U, Tuuttila A, Stetler-Stevenson WG, Tryggvason K: Autolytic activation of recombinant human 72 kilodalton type IV collagenase. *Biochemistry* 1995, 34(9):2819-2825.
334. Qin QP, Christiansen M, Nørgaard-Pedersen B. Double-monoclonal immunofluorometric assays for pregnancy-associated plasma protein A/proeosinophil major basic protein (PAPP-A/proMBP) complex in first-trimester maternal serum screening for Down syndrome. *Clin Chem*. 1997 Dec;43(12):2323-32
335. Wald NJ, George L, Smith D, Densm JW, Petterson K: Serum screening for Down's syndrome between 8 and 14 weeks of pregnancy. International Prenatal Screening Research Group. *Br J Obstet Gynaecol* 1996, 103(5):407-412
336. Piñón P, Kaski JC. [Inflammation, atherosclerosis and cardiovascular disease risk: PAPP-A, Lp-PLA2 and cystatin C. New insights or redundant information?]. *Rev Esp Cardiol*. 2006 Mar;59(3):247-58
337. Conover CA: Key questions and answers about pregnancy-associated plasma protein-A. *Trends Endocrinol Metab* 2012, 23(5):242-249.
338. Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS: The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 2000, 86(2):125-130.
339. Kalousová M, Benáková H, Kuběna AA, Dusilová-Sulková S, Tesař V, Zima T: Pregnancy-associated plasma protein A as an independent mortality predictor in long-term haemodialysis patients. *Kidney Blood*

Press Res 2012, 35(3):192-201.

340. Coskun A, Bicik Z, Duran S, Alcelik A, Soypacaci Z, Yavuz O, Oksuz S. Pregnancy-associated plasma protein A in dialysis patients. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(1):63-6.

341. Cosin-Sales J, Kaski JC, Christiansen M, Overgaard MT, Cole D, Holt DW. Relationship among pregnancy associated plasma protein-A levels, clinical characteristics, and coronary artery disease extent in patients with chronic stable angina pectoris. *Eur Heart J*. 2005 Oct;26(20):2093-8.

342. Beaudoux JL¹, Burc L, Imbert-Bismut F, Chapman MJ. Serum plasma pregnancy-associated protein A: a potential marker of echogenic carotid atherosclerotic plaques in asymptomatic hyperlipidemic subjects at high cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Jan 1;23(1).

343. Nagase H, Woessner JF: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999, 274(31):21491-21494.

344. Nagase H, Visse R, Murphy G: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006, 69(3):562-573.

345. Martos R, Baugh J, Ledwidge M, O'Loughlin C, Patle A, Donnelly SC, McDonald K. Diagnosis of heart failure with preserved ejection fraction: improved accuracy with the use of markers of collagen turnover. *Eur J Heart Fail*. 2009 Feb;11(2):191-7.

346. Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol*. 2007 Sep;152(2):189-205

347. Patterson ML, Atkinson SJ, Knäuper V, Murphy G: Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett* 2001, 503(2-3):158-162.

348. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation*. 2004 Nov 30;110(22):3480-7.

349. Lenz O, Elliot SJ, Stetler-Stevenson WG: Matrix metalloproteinases in renal development and disease. *J Am Soc Nephrol* 2000, 11(3):574-581.

350. Catania JM, Chen G, Parrish AR: Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007, 292(3):F905-911.

351. Galis ZS, Khatir JJ: Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002, 90(3):251-262.

352. Chang HR, Yang SF, Li ML, Lin CC, Hsieh YS, Lian JD: Relationships between circulating matrix metalloproteinase-2 and -9 and renal function in patients with chronic kidney disease. *Clin Chim Acta* 2006, 366(1-2):243-248.

353. Sapienza P, di Marzo L, Borrelli V, Sterpetti AV, Mingoli A, Piagnerelli R, Cavallaro A. Basic fibroblast growth factor mediates carotid plaque instability through metalloproteinase-2 and -9 expression. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004 Jul;28(1):89-97.

354. Kunte H, Amberger N, Busch MA, Rückert RI, Meiners S, Harms L. Markers of instability in high-risk carotid plaques are reduced by statins. *J Vasc Surg*. 2008 Mar;47(3):513-22

355. Oak MH, El Bedoui J, Anglard P, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenolic compounds inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to thrombin via direct inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2004 Sep 28;110(13):1861-7.

356. Timms PM, Mannan N, Hitman GA, Syndercombe-Court D, Aganna E, Price CP, Boucher BJ. Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *QJM*. 2002 Dec;95(12):787-96.

357. Loria V, Dato I, et al. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators Inflamm* 2008;2008:135625.

358. 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.

359. Needham DM, Shufelt KA, et al. Troponin I and T levels in renal failure patients without acute coronary syndrome: a systematic review of the literature. *Can J Cardiol* 2004;20:1212-1218.

360. Horwich TB, Patel J, MacLellan WR, et al. Cardiac troponin I is associated with impaired hemodynamics, progressive left ventricular dysfunction, and increased mortality rates in advanced heart failure. *Circulation* 2003;108:833-838.

361. Maisel AS, Katz N, Hillege HL, Shaw A, et al. Acute Dialysis Quality Initiative consensus group.

- Biomarkers in kidney and heart disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Jan;26(1):62-74.
362. Zadravil J, Horak P. Pathophysiology of anemia in chronic kidney diseases. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2014 Jan 3. doi: 10.5507/bp.2013.093
363. Wittwer I. Iron deficiency anaemia in chronic kidney disease. *J Ren Care*. 2013 Sep;39(3):182-8.
364. London GM, Pannier B, Guerin AP, Blacher J, Marchais SJ, Darne B, Metivier F, Adda H, Safar ME.: Alterations of left ventricular hypertrophy in and survival of patients receiving hemodialysis: Follow-up of an interventional study. *J Am Soc Nephrol* 12: 2759–2767, 2001
365. Portolés J, Torralbo A, Martin P, Rodrigo J, Herrero JA, Barrientos A.: Cardiovascular effects of recombinant human erythropoietin in predialysis patients. *Am J Kidney Dis* 29: 541–548, 1997
366. Ritz E, Laville M, O'Donoghue D, de Alvaro F.: Anemia Correction in Diabetes Study Investigators: Target level for hemoglobin correction in patients with diabetes and CKD: Primary results of the Anemia Correction in Diabetes (ACORD) Study. *Am J Kidney Dis* 49: 194–207, 2007
367. Foley RN, Parfrey PS, Fine A, Handa P, Kingma I, Lau CY, Levin A, Mendelssohn D, Muirhead N, Murphy B, Plante RK, Posen G, Wells GA.: Effect of hemoglobin levels in hemodialysis patients with asymptomatic cardiomyopathy. *Kidney Int* 58: 1325–1335, 2000.
368. Drüeke TB, Locatelli F, Clyne N, Eckardt KU, Macdougall IC, Tsakiris D, Burger HU, Scherhag A. CREATE Investigators: Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia. *N Engl J Med* 355: 2071–2084, 2006.
369. Besarab A, Bolton WK, Browne JK, Egrie JC, Nissenson AR, Okamoto DM, Schwab SJ, Goodkin DA.: The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. *N Engl J Med* 339: 584–590, 1998
370. Schurgers LJ. Vitamin K: key vitamin in controlling vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2013 May;83(5):782-4.
371. Hanly PJ, Pierratos A: Improvement of sleep apnea in patients with chronic renal failure who undergo nocturnal hemodialysis. *N Engl J Med* 344: 102–107, 2001
372. Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, Lichtman JH, Mohsenin V: Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N Engl J Med* 353: 2034–2041, 2005
373. Glassman AH, Shapiro PA: Depression and the course of coronary artery disease. *Am J Psychiatry* 155: 4–11, 1998
374. Raison CL, Capuron L, Miller AH: Cytokines sing the blues: Inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* 27: 24–31, 2006
375. Elder SJ, Pisoni RL, Akizawa T, Rayner HC, Saran R: Sleep quality predicts quality of life and mortality risk in haemodialysis patients: Results from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol Dial Transplant* 23: 998–1004, 2008
376. Tonelli M. Serum phosphorus in people with chronic kidney disease: you are what you eat. *Kidney Int*. 2013 Nov;84(5):871-3.
377. Stenvinkel P, Carrero JJ, Axelsson J, et al.: Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:505-521.
378. Kelly KJ. Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1549-1558.
379. Park SH¹, Stenvinkel P, Lindholm B. Cardiovascular biomarkers in chronic kidney disease. *J Ren Nutr*. 2012 Jan;22(1):120-7.
380. Cai QZ¹, Lu XZ², Lu Y³, Wang AY⁴. Longitudinal changes of cardiac structure and function in CKD (CASCADE study). *J Am Soc Nephrol*. 2014 Jul;25(7):1599-608.
381. Seifert ME, de Las Fuentes L, Dávila-Román VG, Hruska KA. Left ventricular mass progression despite stable blood pressure and kidney function in stage 3 chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2014;39(5):392-9.
382. Farshid A, Pathak R, Shadbolt B, Arnolda L, Talaulikar G. Diastolic function is a strong predictor of mortality in patients with chronic kidney disease. *BMC Nephrol*. 2013 Dec 23;14:280
383. Eckardt KU, Scherhag A, Macdougall IC, Tsakiris D, Clyne N, Locatelli F, Zaugg MF, Burger HU, Drueke TB. Left ventricular geometry predicts cardiovascular outcomes associated with anemia correction in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Dec;20(12):2651-60.
384. Nakamura T, Funayama H, Kubo N, Yasu T, Kawakami M, Momomura S, Ishikawa SE: Elevation of

- plasma placental growth factor in the patients with ischemic cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2009, 131(2):186-91.
385. Isakova T, Xie H, Gutiérrez OM, Steigerwalt S, He J, Leonard M, Wolf M; Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Group: Fibroblast growth factor 23 and risks of mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease. *JAMA.* 2011, 305(23):2432-9.
386. Custódio MR, Koike MK, Batista DG, Magalhães AO, Hawlitschek P, Oliveira IB, Dominguez WV, Moysés RM, Jorgetti V.: Parathyroid hormone and phosphorus overload in uremia: impact on cardiovascular system. *Nephrol Dial Transplant.* 2012, 27(4):1437-45.
387. Canziani ME, Tomiyama C, Higa A, Draibe SA, Carvalho AB: Fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease: bridging the gap between bone mineral metabolism and left ventricular hypertrophy. *Blood Purif.* 2011, 31(1-3):26-32
388. Waheed AA, Pedraza F, Lenz O, Isakova T. Phosphate control in end-stage renal disease: barriers and opportunities. *Nephrol Dial Transplant.* 2013 Dec;28(12):2961-8
389. Fliser D, Kollerits B, Neyer U et al.. Fibroblast growth factor 23 (FGF-23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(9):2600-8.
390. Cioffi G, Tarantini L, Frizzi R, Stefenelli C, Russo TE, Selmi A, Toller C, Furlanello F, de Simone G: Chronic kidney disease elicits excessive increase in left ventricular mass growth in patients at increased risk for cardiovascular events. *J Hypertens.* 2011, 29(3): 565-73.
391. Levin A, Thompson CR, Ethier J, Mendelssohn D, Singer J, Djurdjev O. Left ventricular mass index increase in early renal disease: impact of decline in hemoglobin. *Am J Kidney Dis.* 1999 Jul;34(1):125-34.
392. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. In., vol. Suppl. 2013; 1-150.: *Kidney Int;* 2013: 1-150.
393. Voelkl J, et al. Spironolactone ameliorates PIT1-dependent vascular osteoinduction in klotho-hypomorphic mice. *J Clin Invest.* 2013;123(2):812–822.
394. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996 May;49(5):1304-13
395. 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.
396. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Seward J, Shanewise JS, Sutton MS, Stewart WJ, Chamber Quantification Writing Group, American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee, European Association of Echocardiography: Recommendations for chamber quantification: a report from the American society of Echocardiography's guidelines and standards committee and the chamber quantification writing group, 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.
397. Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC, Flachskampf FA, Pelikka PA, Evangelisa A: Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *Eur J Echocardiogr* 2009, 10(2):165–193.
398. Henkel DM, Glockner J, Miller WL: Association of myocardial fibrosis, B-type natriuretic peptide, and cardiac magnetic resonance parameters of remodeling in chronic ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2011, 109(3):390–394.
399. Torry RJ, Tomanek RJ, Zheng W, Miller SJ, Labarrere CA, Torry DS: Hypoxia increases placental growth factor expression in human myocardium and cultured neonatal rat cardiomyocytes. *J Heart Lung Transplant* 2009, 28(2):183–190.
400. Cassidy A: Potential role for plasma placental growth factor in predicting coronary heart disease risk in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, 29(1):134–139.
401. Roncal C, Buyschaert I, Gerdes N, Fischer C, Stassen JM, Moons L, Collen D, De Bock K, Hansson GK, Carmeliet P: Short-term delivery of anti-PlGF antibody delays progression of atherosclerotic plaques to vulnerable lesions. *Cardiovasc Res* 2010, 86(1):29–36.
402. McQuarrie EP, Patel RK, Mark PB, Jardine AG: Association between proteinuria and left ventricular mass index: a cardiac MRI study in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2011,

26(3):933–938.

403. Patel RK, Jardine AG, Mark PB, Stevens KK, Dargie HJ, Jardine AG: Association of left atrial volume with mortality among ESRD patients with left ventricular hypertrophy referred for kidney transplantation. *Am J Kidney Dis* 2010, 55(6):1088–1096.
404. Chen SC, Su HM, Hung CC, Chang JM, Chen HC: Echocardiographic parameters are independently associated with increased cardiovascular events in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2012, 27(3):1064–1070.
405. Lindsey JB, Cipollone F, McGuire DK: Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): cardiovascular implications. *Diab Vasc Dis Res* 2009, 6(1):7–14.
406. Flierl MA, Rittirsch D, Chen AJ, Hoesel LM, Gao H, Van Rooijen N, Huber-Lang MS, Neubig RR, Ward PA: Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 449: 721–725, 2007
407. Cice G, Ferrara L, D'Andrea A, D'Isa S, Calabro R: Carvedilol increases two-year survival in dialysis patients with dilated cardiomyopathy: A prospective, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 41: 1438–1444, 2003
408. Evans M, Bain SC, Bilous RW; Collaborative Study Group participants. Irbesartan delays progression of nephropathy as measured by estimated glomerular filtration rate: post hoc analysis of the Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Jun;27(6):2255-63.
409. Oberleithner H, Callies C, Kusche-Vihrog K, Schillers H, Shahin V, Riethmüller C, Macgregor GA, de Wardener HE: Potassium softens vascular endothelium and increases nitric oxide release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2829–2834, 2009
410. Turnbull F: Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: Results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration*. *Lancet* 362: 1527–1535, 2003
411. Zager PG, Nikolic J, Brown RH, Clark E, Sadler JH, Teredesai P: “U” curve association of blood pressure and mortality in hemodialysis patients. *Medical Directors of Dialysis Clinic, Inc. Kidney Int* 54: 561–569, 1998
412. Kannel WB, Wilson PW, Nam BH, D'Agostino RB, Li J: A likely explanation for the J-curve of blood pressure cardiovascular risk. *Am J Cardiol* 94: 380–384, 2004
413. Kovesdy CP, Bleyer AJ, Molnar MZ, Kalantar-Zadeh K. Blood pressure and mortality in U.S. veterans with chronic kidney disease: a cohort study. *Ann Intern Med*. 2013 Aug 20;159(4):233-42.
414. Agarwal R, Sinha AD, Tegegne GG. Hypertension in hemodialysis patients treated with atenolol or lisinopril: a randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Mar;29(3):672-81.
415. Wang JG, Li Y, Safar M: Prevention of stroke and myocardial infarction by amlodipine and Angiotensin receptor blockers: A quantitative overview. *Hypertension* 50: 181–188, 2007
416. Wali RK, Wang GS, Gottlieb SS, Bellumkonda L, Drachenberg C, Weir MR: Effect of kidney transplantation on left ventricular systolic dysfunction and congestive heart failure in patients with end-stage renal disease. *J Am Coll Cardiol* 45: 1051–1060, 2005
417. Olauson H¹, Larsson TE. FGF23 and Klotho in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013 Jul;22(4):397-404.
418. Finch JL, Lee DH, Liapis H, Ritter C, Zhang S, Suarez E, Ferder L, Slatopolsky E. Phosphate restriction significantly reduces mortality in uremic rats with established vascular calcification. *Kidney Int*. 2013 Dec;84(6):1145-53.
419. Block GA, Wheeler DC, Persky MS, Kestenbaum B, Allison MA, Chertow GM. Effects of phosphate binders in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2012 Aug;23(8):1407-15.
420. Lomashvili KA, Narisawa S, Millán JL, O'Neill WC. Vascular calcification is dependent on plasma levels of pyrophosphate. *Kidney Int*. 2014 Jun;85(6):1351-6.
421. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360:20–33
422. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud C. Antioxidant supplements and mortality. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014 Jan;17(1):40-4.
423. Brown BG, Zhao XO, Chait A et al. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N Engl J Med* 2001; 345:1583–1592
424. Castillo RL, Arias C, Farías JG. Omega 3 chronic supplementation attenuates myocardial ischaemia-

- reperfusion injury through reinforcement of antioxidant defense system in rats. *Cell Biochem Funct.* 2014 Apr;32(3):274-81
425. Friedman AN, Yu Z, Tabbey R, Denski C, Tamez H, Wenger J, Thadhani R, Li Y, Watkins BA. Inverse relationship between long-chain n-3 fatty acids and risk of sudden cardiac death in patients starting hemodialysis. *Kidney Int.* 2013 Jun;83(6):1130-5.
426. Sommerburg O, Grune T, Hampl H et al. Does long-term treatment of renal anaemia with recombinant erythropoietin influence oxidative stress in haemodialysed patients? *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:2583–2587
427. Ishimitsu T¹, Ohno E, Ueno Y, Onoda S, Nagase A, Ohira T, Nakano N, Satonaka H. Effects of atorvastatin and ezetimibe on endothelial function in dyslipidemic patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 2013 Nov 7.
428. Kim CS. Pharmacologic Management of the Cardio-renal Syndrome. *Electrolyte Blood Press.* 2013 Jun;11(1):17-23.
429. Rosansky SJ, Cancarini G, Clark WF, Eggers P, Germaine M, Glassock R, Goldfarb DS, Steiner R, Zuo L. Dialysis initiation: what's the rush? *Semin Dial.* 2013 Nov-Dec;26(6):650-7.
430. Galli F, Rovidati S, Chiarantini L, Buoncristiani U. Bioreactivity and biocompatibility of a vitamin E-modified multi-layer hemodialysis filter. *Kidney Int* 1998; 54:580–589
431. Zaritsky J, Rastogi A, Fischmann G, Gales B, Salusky IB, Wesseling-Perry K. Short daily hemodialysis is associated with lower plasma FGF23 levels when compared with conventional hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2014 Feb;29(2):437-41.
432. Knap B¹, Večerić-Haler Ž, Benedik M, Bren AF. Fibroblast growth factor 23 and left ventricular mass index in maintenance hemodialysis patients: standard versus long nocturnal hemodialysis. *Ther Apher Dial.* 2013 Aug;17(4):407-11.
433. Gutierrez OM, et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 2008;359(6):584–592.
434. Cai B, Pan Z, Lu Y. The roles of microRNAs in heart diseases: a novel important regulator. *Curr Med Chem.* 2010;17(5):407-11
435. Collins AJ, Foley RN, Chavers B, Gilbertson D, et al.: US Renal Data System 2013 Annual Data Report. *Am J Kidney Dis.* 2014 Jan;63(1 Suppl):A7.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

8.1. SEZNAM. PUBLIKACÍ, KTERÉ BYLY PODKLADEM DISERTAČNÍ PRÁCE

Peiskerová M, Kalousová M, Danzig V, Míková 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, Dusilová-Sulková S, Uhrová J, Bandúr S, Malbohan IM, Zima T, Tesař V. Fibroblast growth factor 23 and matrix-metalloproteinases in patients with chronic kidney disease: are they associated with cardiovascular disease? *Kidney Blood Press Res.* 2009;32(4):276-83. (IF 1, 596)

8.2. SEZNAM OSTATNÍCH PUBLIKACÍ

Haluzik M, Sulková S, Svobodová J, Bednářová V, Bodláková B, Marková M, Turková 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)

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)

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