

## Kalcifikace cév při chronickém onemocnění ledvin stadia 5: jaká je role cirkulujících inhibitorů?

Moe S, Reslerova M, Ketteler M, et al. Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int* 2005;67:2295-2304.

Kardiovaskulární riziko pacientů se selháním ledvin je 10–20krát vyšší ve srovnání s osobami bez onemocnění ledvin. Většina pacientů se selháním ledvin stadia 5 dle klasifikace K/DOQI má prokazatelné cévní kalcifikace. Rozsah kalcifikací v koronárních cévách je u dialyzovaných pacientů dokonce dvakrát až pětkrát větší než u osob s prokázanou ischemickou chorobou a normální funkcí ledvin (Braun, 1996).

Výrazným rizikovým faktorem kardiovaskulárního postižení a zejména kalcifikací cév, chlopní a dalších struktur u dialyzovaných pacientů je porucha fosfokalciového metabolismu.

Avšak i přes výraznou predispozici k ukládání sloučenin vápníku a fosforu do cévní stěny zůstává přibližně u 17 % pacientů se selháním ledvin cévní stěna kalcifikacemi nepostižena (Hujairi, 2004).

Fyziologické koncentrace fosforu a vápníku přítomné představují stav supersaturace obou prvků, tj. okolnost, kdy dochází k precipitaci. To znamená, že za fyziologických okolností je organismus vybaven určitou „ochranou“ proti tomu, aby k precipitaci nedocházelo. Autoři provedli komplex experimentů *in vivo*, *ex vivo* a *in vitro*, se zaměřením na tři takovéto cirkulující faktory: fetuin A, matrix GLA protein (MGP) a osteoprotegerin.

U dialyzovaných pacientů, u pacientů po transplantaci ledviny a u zdravých kontrol stanovili souběžně sérové koncentrace fetuinu A (alfa-2-Heremans-Schmidův glykoprotein; Ahsg), MGP a osteoprotegerinu spolu s parametry fosfokalciového metabolismu. Souběžně vyšetřili metodou spirálního CT semikvantitativně kalcifikace koronárních cév a aorty. Zjistili inverzní vztah mezi koncentrací fetuinu A v krvi a stupněm kalcifikací ( $r = -0,30$ ;  $p = 0,034$ ), tj. kalcifikace byly větší, pokud koncentrace fetuinu A klesala. Naopak, osteoprotegerin se stupněm kalcifikací koreloval pozitivně ( $r = 0,29$ ). Současně byly i výrazně rozdílné sérové koncentrace osteoprotegerinu v jednotlivých podskupinách dle stupně kalcifikací: průměrná koncentrace u pacientů bez koronárních kalcifikací byla 6,23 pmol/l,  $n = 18$ ), zatímco u pacientů s kalcifikacemi byla 10,56 pmol/l;  $n = 48$ ;  $p = 0,001$ ), analogický rozdíl byl zaznamenán i u kalcifikací aorty. Na rozdíl od fetuinu A (negativní korelace) a osteoprotegerinu (pozitivní korelace) nebyla pro sérové koncentrace MGP (matrix GLA protein) zjištěna žádná statistická souvislost s výskytem či rozsahem cévních kalcifikací.

Při sledování sérových koncentrací v čase u podskupiny pacientů, kteří byli transplantováni (srovnání s obdobím před transplantací a s odstupem 15 až 20 měsíců po transplantaci), byly zjištěny následující změny: koncentrace fetuinu A a GLA v séru se statisticky zvýšily ( $p < 0,05$ ), zatímco koncentrace osteoprotegerinu velmi významně klesla ( $p < 0,001$ ). Zlepšení funkce ledvin tedy nejasným mechanismem zasahuje do sérových koncentrací faktorů ovlivňujících *in vivo* kalcifikaci cév. Fetuin A po transplantaci stoupá, není však známo, zda je to důsledkem jeho vyšší syntézy (v játrech) či menší spotřebou či degradací.

Studie *ex vivo* představovala imunohistochemické vyšetření vzorku cévní stěny (přibližně 2 cm velký úsek arteria gastrica inferior, odebraný při transplantaci ledviny), se zaměřením na přítomnost uvedených tří faktorů přímo v cévní stěně. Bylo zjištěno, že čím více byla stěna vyšetřovaného vzorku kalcifikována, tím větší byla imunohistochemicky detekovatelná depozita fetuinu A i depozita MGP.

Fetuin A představuje jednoznačně ochranný faktor proti kalcifikacím (Ketteler, 1999; Cozzolino, 2005). Patogenetický význam přítomnosti fetuinu A v cévní stěně je zcela nejasný, autoři uvádějí několik možných hypotéz, včetně ochrany proti progresi, tj. vytvořený fetuin A byl podle této hypotézy deponován z krve do cév za účelem zábrany dalších kalcifikací.

Studie *in vitro* sledovaly chování buněčných kultur bovinních hladkých svalových buněk (BVSMC – bovine vascular smooth muscle cells) za podmínek inkubace s uremickým směsným sérem či směsným sérem zdravých osob, vždy ve dvou situacích: za neutrálních podmínek (tj. samotné přidání séra) a za podmínek indukujících kalcifikační proces (přidání  $\beta$ -glycerolfosfátu a dalších látek do media se sérem). Kalcifikační proces *in vitro* byl sledován též po přidání fetuinu A v různých koncentracích do media, a to k normálnímu i k uremickému směsnému séru.

Výsledky byly následující: kalcifikační proces byl výrazně méně vyjádřen v kulturách s normálním směsným sérem neboli uremické sérum samo o sobě umožňovalo snazší indukci kalcifikačního děje. Přidání fetuinu A tento proces zpomalilo, a to v normálním i uremickém séru.

Autoři tedy v komplexní sérii experimentů *in vivo*, *ex vivo* a *in vitro* ukázali, že uvedené tři faktory (fetuin A, matrix GLA protein, osteoprotegerin) jsou významnými endogenními faktory v procesu kalcifikací cévní stěny u pacientů se selháním ledvin. Jejich jednotlivé role se však odlišují v mechanismu působení i v míře významu. Jednoznačné je spojení mezi fetuinem A a kalcifikacemi, kdy fetuin A představuje endogenní cirkulující ochranný faktor.



## KOMENTÁŘ Prof. MUDr. Sylvie Dusilová Sulková, DrSc.

Nedávné práce prokázaly, že kalcifikace cévní stěny dialyzovaných pacientů jsou nejen velmi rozsáhlé (ve srovnání s normální populací) a prognosticky nepříznivé, ale přinesly i detailnější pohled do jejich patogeneze. Nejedná se jen o pasivní důsledek vysokých koncentrací fosforu nebo vápníku (tedy fosfokalciového součinu). Bylo ukázáno, že kalcifikace jsou důsledkem aktivních procesů. Zcela klíčové je totiž experimentální zjištění, že za určitých podmínek se může změnit genotyp buněk hladké svaloviny v genotyp buněk, které se chovají jako buňky kostní tkáně (Moe, 2002; Chen, 2002; Cozzolino, 2005).

Studie Chena a spol. z roku 2002 ukázala poprvé, že kalcifikace mohou být ovlivněny uremickým prostředím bez vztahu ke koncentraci fosforu. To znamená, že prokalcifikační vliv fosforu je modifikován ( zesílen) při selhání ledvin, pravděpodobně změnou složení séra (zvýšení podílu prokalcifikačních faktorů či snížení podílu faktorů inhibujících kalcifikace).

V procesu indukce či inhibice ektopických kalcifikací se uplatňuje několik genů. K inhibičním patří geny pro osteopontin, matrix GLA protein (MGP), fetuin A a osteoprotegerin.

MGP je extracelulární protein s vysokou afinitou pro hydroxyapatit, je nutný pro normální kostní formaci a inhibici vaskulárních kalcifikací, jeho potenciální role u chronického selhání ledvin je z velké části nejasná.

Fetuin A je velmi významným inhibítozem ektopických kalcifikací. In vitro výrazně inhibuje precipitaci kalcium fosfátu de novo, avšak na již vytvořená depozita nemá vliv. U myši bez daného genu („knock-out“) se vyskytují multiorgánové rozsáhlé kalcifikace. Je syntetizován v játrech. Po přidání do média v komentovaném experimentu výrazně oslabil aktivní kalcifikační proces, to znamená, že jeho role je průkazná a aktivní.

Méně je známo o příčinách poklesu jeho koncentrace v séru. Ty mimo jiné výrazně klesají při zánětu a zcela nově se usuzuje, že tento pokles by mohl mít negativní význam i v kontextu syndromu MIA a v kardiovaskulární mortalitě (Ketteler, 2003). Fetuin A též vytváří komplex s MGP, tento komplex má inhibiční význam v mineralizaci kostí in vivo.

V dané studii byly sérové koncentrace fetuinu A v inverzním vztahu k semikvantitativně určenému stupni koronárních i aortálních kalcifikací pozorovaných spirální CT. Nebyla však zjištěna statisticky významná koncentrace v séru mezi jednotlivými podskupinami, i když byl zjištěn určitý trend. To může znamenat, že sérová koncentrace fetuinu A je jen okrajovým, méně důležitým faktorem, tj. pro určení významu fetuinu A nemá přímý význam. Nález fetuinu A v cévní stěně by mohl např. znamenat vychytání fetuinu zde, s cílem zabránit dalšímu pokračování pa-

tologického cévního procesu. Avšak jde o spekulativní vysvětlení, autoři sami přiznávají, že význam přítomnosti fetuinu A v cévách zůstává nejasný.

Význam osteoprotegerinu v procesu kalcifikace a kostní mineralizace byl rovněž demonstrován u „knock-out“ myši. Je tedy zřejmé, že uvedené tři faktory jsou důležitými endogenními faktory rozvoje mimokostní (cévní) kalcifikace.

Komentovaná studie je jednou z těch nemnoha, které se in vivo i experimentálně snaží o poznání, zda je role těchto inhibitorů zachována i při selhání ledvin, resp. zda a do jaké míry jsou nálezy výrazných a částých kalcifikací cév při selhání ledvin ovlivněny případnými změnami těchto faktorů. Již z dřívějších studií je zřejmé, že zvýšená koncentrace fosforu v séru vede ke kalcifikacím, a to nejen pasivně, ale i aktivně, změnou fenotypu buněk hladké svaloviny. Vztah mezi touto přeměnou a rolí zmiňovaných inhibitorů zůstává nejasný, je však pravděpodobně, že dosud nejasnými mechanismy je funkce inhibitorů kalcifikací při selhání ledvin u většiny pacientů oslabena.

Současné znalosti, i když se stále rozšiřují, neumožňují implikaci do praktické klinické roviny. Protože však některé z látek, vážících fosfor v gastrointestinálním traktu, zmírňují i proces kalcifikací, je nyní sledován i vztah inhibitorů kalcifikace a vazačů. Pro nás je důležité si uvědomit, že kalcifikace cév dialyzovaných pacientů jsou velmi složitým procesem, ve kterém hraje roli celá kaskáda faktorů a jejich vzájemných souvislostí. Uvedené tři faktory nepatří k těm, které by se rutinně vyšetřovaly, avšak výzkum v oblasti intenzivně pokračuje a lze doufat, že obohatí nejen teoretické poznání, ale v důsledcích přinese aktivní doporučení pro naše klinické postupy.

### Literatura

- Braun J, Oldendorf M, Moshage W, et al. Electron beam computed tomography in the evaluation of cardiac calcification in chronic dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1996;27:394–401.
- Cozzolino M, Brancaccio D, Gallieni M, et al. Pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005;68:429–436.
- Chen NX, O'Neill KD, Duan D, et al. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 2002;62:1724–1731.
- Hujairi NM, Afzali B, Goldsmith DJ. Cardiac calcification in renal patients. What we do and don't know. *Am J Kidney Dis* 2004;43:234–243.
- Ketteler M, Bonhartz P, Westenfeld R, et al. Association of low fetuin A (AHSG) concentration in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: A cross-sectional study. *Lancet* 2003;361:827–833.
- Moe SM, Duan D, Slehle BP, et al. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int* 2003;63:1003–1011.
- National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39(Suppl 1):S18–S31.