

## **Oponentský posudek na disertační práci MUDr. Lenky Hoškové**

### **Experimentální a klinické aspekty nefrotoxicity kalcineurinových inhibitorů**

Předložená doktorandská práce zpracovává problematiku kalcineurinové nefrotoxicity a to jak v experimentu, tak v klinické praxi, kde je základem klinická randomizovaná studie u pacientů po transplantaci srdce.

Formálně je práce tvořena těmito oddíly; souhrnem, teoretickým úvodem, vlastní experimentální prací s diskuzí, vlastní klinickou prací s diskuzí, závěrem a literaturou. Na závěr literatury je podán výčet prací autorky, ze kterých disertace vychází.

V úvodu je přehledně rozvedena problematika imunosuprese po transplantaci srdce, včetně jejích nežádoucích účinků, zejména nefrotoxicity. Jsou rozebrány jednotlivé patofyziologické mechanismy, které se na nefrotoxicitě podílejí: renin-angiotenzinový systém, sympatický nervový systém, endotelinový systém, oxidační stres či transport sodíku v ledvinách. Naopak oxid dusnatý působí protektivně. Samostatně je rozebrána problematika hypertenze po transplantaci srdce a možnosti její léčby.

Vlastní práci tvoří celkem 82 stránek, dalších 9 stránek je literatura s uvedením 173 citací, dále 27 obrázků a 5 tabulek. Práce vychází ze 3 prvoautorských publikací v časopisech s IF: Hypertension Research (IF 2,658), Annals of Transplantation (IF 1,252) a Physiological Research (IF 1,643).

#### Cíle práce:

##### 1. experimentální část:

- srovnání podávání dvou způsobů kombinační léčby potencované podáváním CNI v experimentálním modelu hypertenzních a normotenzních potkanů s progresivním poškozením ledvin
- ověřit, zda-li duální inhibice RAS zmírní rozvoj nefrotoxicity u potkanů, kterým byl podáván takrolimus. Ke srovnání byl použit kombinační režim betablokátoru a kalciového antagonisty.

##### 2. klinická část:

- ověřit, zda biomarkery jsou užitečné pro diagnostiku a predikci ledvinného poškození v časném pooperačním období
- zjistit, zda kombinace antihypertenziv s duální blokádou RAS bude stejně účinná v kontrole krevního tlaku jako standardní režimy

- posoudit, zda-li účinná kombinační léčba hypertenze ( duální inhibice RAS nebo standardní kombinace) povede ke zmírnění progresu chronického onemocnění ledvin u pacientů s dlouhodobou imunosupresivní profylaxí.

### Experimentální část

#### Metodika:

Studie byla provedena celkem na 78 krysích samcích. Tento soubor byl rozdělen na hypertenzní (HT) a normotenzní (NT), kteří byli dále randomizováni k podávání takrolimu nebo kontroly. Opět tato ramena byla dále rozdělena na léčbu kombinační (amlodipin+metoprolol), duální blokáda RAAS ( perindopril+losartan) a kontroly. Celkem tak bylo vytvořeno 12 skupin po 6 nebo 8 zvířatech. Každé 4 týdny byly prováděny odběry kreatininu a stanovena albuminurie, celkové sledování bylo 4 měsíce. Poté byla zvířata dekapitována a stanoveny hladiny plazmatické reninové aktivity, plazmatické a renální hladiny angiotenzinu II a histologické zpracování. Byl hodnocen glomerulosklerotický index (GSI) a tubulointersticiální poškození (TIP). V další fázi pokusu byl sledován vliv takrolimu na expresi mRNA pro renin a angiotenzinogen.

#### Výsledky:

u NT potkanů se TKS v průběhu experimentu neměnil, u HT bez léčby vzrůstal. U skupiny s podáváním takrolimu došlo ke vzrůstu TKS, jak u NT, tak u HT potkanů. Léčba amlodipinem s metoprololem vedla při podáváním takrolimu u HT i NT potkanů ke snížení TKS, avšak duální inhibice RAS ( perindopril+losartan) vedla k výraznějšímu snížení TKS u HT potkanů s takrolimem.

Hladina plasmatického kreatininu se u NT i HT potkanů s podáváním takrolimu zvýšila, při podáváním obou typů antihypertenzní medikace došlo k jejímu poklesu.

Albuminurie byla větší u HT než u NT krys. K významnému snížení albuminurie vedla kombinace duální antihypertenzní léčby, ne standardní. Pokles albuminurie byl patrný i v obou skupinách s takrolimem a duální blokádou RAS, nikoliv se standardní léčbou.

Cirkulující angiotenzin II nebyl rozdílný mezi kontrolami NT nebo HT krys, ani při podání takrolimu. Renální angiotenzin II se nelišil mezi NT a HT kontrolami, bylo však patrné statisticky významné zvýšení u NT a HT skupin s podáváním takrolimu. Pokud dostávali NT i HT potkani s takrolimem duální blokádu, došlo k signifikantnímu snížení renálního angiotenzinu II. Standardní antihypertenzní léčba hladinu renálního angiotenzinu II neovlivnila. Při histologickém vyšetření bylo významně vyšší sklerotické i intersticiální poškození mezi NT a HT a to jak u kontrol, tak při podáváním takrolimu. Při podáváním takrolimu došlo jak u NT, tak

u HT skupiny k nárůstu poškození. Pouze duální antihypertenzní léčba zlepšila obojí typ renálního poškození ( sklerotických i tubulointersticiálních změn).

Takrolimus nevedl ke zvýšení plasmatické hladiny reninu či ke zvýšené expresi mRNA angiotenzinogenu v játrech. Podávání takrolimu však vedlo ke zvýšené expresi mRNA pro-reninu a angiotenzinogenu v ledvinách a to jak u NT, tak HT skupiny.

Shrnutí experimentální části:

Dlouhodobé podávání takrolimu vede k rozvoji arteriální hypertenze a poškození ledvin, a to jak u NT, tak u HT kmene především v důsledku zvýšené aktivity RAS v ledvinách potvrzené zvýšenou expresí mRNA pro-reninu angiotenzinogenu. Podání duální inhibice RAS vedlo k účinné léčbě hypertenze a zmírnění nefrotoxicity, nejenom u NT, ale zejména i u HT kmenů při podání takrolimu. Kombinace betablokátor a blokátor vápníkového kanálu sice také účinně snižovala krevní tlak, ale vliv na nefrotoxicitu vystupňovanou podáváním takrolimu, neměla.

### Klinická část

#### Vliv imunosuprese na rozvoj akutního poškození ledvin po transplantaci a možnosti časné diagnostiky

Metodika:

Do souboru bylo zařazeno 117 pacientů časně po transplantaci srdce. Byli rozděleni na ty, kteří měli akutní poškození ledvin (AKI) definované jako zvýšení kreatininu nad 50% nebo nutnost použití eliminační metody, a pacienty bez AKI. Byly odebírány sérové hladiny kreatininu a cystatinu C, z moči byl stanoven NGAL, alfa-1- mikroglobulin a albuminurie. Laboratorní sledování bylo 30 dnů a dále zjištěna jednoletá mortalita.

Výsledky:

Skupinu s AKI tvořilo 30 pacientů, bez AKI 87. Pacienti s AKI měli těžší potransplantační průběh, měli častěji implantovanou pravostrannou srdeční podporu nebo VA-ECMO, častější infekční komplikace a revizi krvácení z rány a delší hospitalizaci na ARK.

V diagnostice AKI byl nejlepší ze sledovaných parametrů cystatin C, který se zvýšil již 3 hodiny po operaci a toto statisticky významné zvýšení trvalo 7. i 30. den. Zvýšení cystatinu C 7.den po operaci bylo spojeno se zhoršeným jednoletým přežíváním. Naopak u vyšetření NGAL nebyl jasný vztah k predikci AKI prokázán.

### Klinická část

## Účinky duální blokády RAS systému ve srovnání s konvenční kombinací antihypertenziv na kontrolu krevního tlaku a chronickou nefrotoxicitu vyvolanou takrolimem u pacientů po transplantaci srdce

### Metodika:

Do studie byli zařazeni pacienti po transplantaci s rozvojem arteriální hypertenze definované jako TK > 150/90 mm Hg. Celkem bylo randomizováno 84 pacientů. 44 dostávalo standardní kombinaci antihypertenziv (skupina 1), 40 pacientů duální blokádu RAS (perindopril + losartan) (skupina 2). 9 pacientů ze skupiny 2 bylo vyřazeno, z toho 2 pro intoleranci ACEi. Z téže skupiny bylo v průběhu sledování vyřazeno dalších 5 pacientů: 2 pro hypotenzi, 1 pro zhoršení renálních funkcí a 2 pro hyperkalémii.

Ve skupině 1 zahrnovala kombinační léčba podání kalciového antagonisty (amlodipin) a/nebo betablokátor (metoprolol) a/nebo diuretikum a/nebo ACEi (perindopril). Ve skupině 2 byla léčba zahájena ACEi perindopilem, přidán blokátor receptoru 1 pro angiotenzin 2 (losartan) a pokud nebylo dosaženo cílových hodnot, tak byl přidán amlodipin, metoprolol nebo furosemid. Mírou účinnosti bylo dosažení cílových hodnot 130/85 mm Hg.

Byly prováděny odběry krve na stanovení hladin kalía, kreatininu, cystatinu C a hladiny takrolimu. Z moči byla stanovena albuminurie a alfa-1-mikroglobulin.

### Výsledky:

Studii dokončilo 42 pacientů ve skupině 1 a pouze 26 ve skupině 2. V obou skupinách došlo ke statisticky významnému poklesu TK oproti randomizaci. Nebyl rozdíl v poklesu TKS ani TKD mezi oběma režimy. Ve skupině 1 (stand. léčba hypertenze) byl vysoký počet pacientů s terapií ACEi+BB (20,4%), kombinaci 3-4 AHT potřebovalo 21%. Tedy zadanou standardní dvojkombinaci mělo pouze 45%. Ve skupině 2 mělo duální blokádu RAS pouze 42,3%, 3-4 kombinaci antihypertenziv mělo 50% pacientů- tedy více než ve skupině 1.

Dávky jednotlivých léků se v obou skupinách statisticky významně nelišily. U skupiny 1 byl perindopril vysazen pro NÚ u 2 pacientů ze 44, zatímco u skupiny 2 pro NÚ z blokády RAS muselo ukončit studii 5 pacientů ze 31. Nebyly významnější rozdíly v doprovodné imunosupresivní léčbě a hladiny takrolimu byly u obou skupin srovnatelné.

### Vliv kombinační léčby hypertenze na renální funkce:

Ve skupině 1 se hodnoty kreatininu oproti randomizaci zvýšily, zatímco ve skupině 2 ke zvýšení nedošlo. Rozdíl mezi skupinami byl statisticky významný.

Glomerulární filtrace se snížila u obou skupin, ale statisticky významně více u skupiny 1. Albuminurie byla významně nižší u skupiny 2 než u skupiny 1. Hladiny alfa-1-mikroglobulinu v moči byly u skupiny 2 po celou dobu nižší než u skupiny 1, statisticky významně v 18 a 24

měsíci. Rovněž hodnoty cystatinu C byly nižší u skupiny 2, statisticky významně pouze ve 12. měsíci. Na konci 2letého sledování bylo chronické onemocnění ledvin přítomné u 74% pacientů skupiny 1, ale pouze u 35% skupiny 2. ( $p < 0,001$ ) Hodnoty draslíku se mezi oběma léčebnými režimy nelišily.

Shrnutí klinické části:

Kombinace antihypertenziv zahrnující duální blokádu RAS byla stejně účinná na snížení krevního tlaku pacientů po transplantaci srdce jako standardní režimy. Duální blokáda RAS vedla ke zmírnění progresu chronického renálního postižení u pacientů s dlouhodobou imunosupresí. To se projevilo nižší albuminurií a nižším poklesem glomerulární filtrace.

### Hodnocení práce

Téma práce je vysoce aktuální. Studie je celkově přehledná, cíle jsou srozumitelné. Metody použité ve studii jsou relevantní. Statistické metody jsou adekvátní. Myšlenka práce je originální. Závěry jsou formálně v souladu s vytyčenými cíli i s prezentovanými výsledky.

Experimentální část práce vytváří teoretický předpoklad ke klinické části práce a celá práce tak vytváří komplexní celek. Dokazuje, že takrolimus se podílí na nefrotoxicitě zejména aktivací intrarenálního systému RAS. Dalším pozitivem je, že práce má praktické klinické výstupy:

1. Měření cystatinu C časně po operaci by mohlo identifikovat pacienty s rizikem renálního poškození. To má praktický význam pro odložené podávání imunosupresiv nebo snížení jejich dávky.

2. Kombinační léčba duální blokádou RAS je účinná a má nefroprotektivní efekt. Je metodou volby u pacientů po transplantaci srdce za předpokladu sledování možných nežádoucích účinků.

### Připomínky

V experimentální větvi nebylo provedeno srovnání kombinační léčby blokády RAS a samostatné léčby ACEi a AT2 blokátoru.

Změny kreatininu při podávání takrolimu u NT a HT krys by si zasloužily samostatný obrázek, tak jako je u všech dalších hodnocených parametrů (albuminurie, TKS, histol. změny atd).

Na str. 67 v klíčových obr. 3a a 3b jsou použity v koláčových grafech pro skupinu 1 jiné barvy pro stejné lékové skupiny při srovnávání zahájení léčby a po 24 měsících - to působí matoucím způsobem a nepřehledně. Pro skupinu 2 je naopak barevné členění zachované.

V klinické části byl v duální inhibici RAS vysoký počet pacientů netolerujících léčbu - celkem 7 a zejména tímto vlivem byly skupiny početně nevyrovnané: dokončení studie 42 vs 26 pacientů.

Velmi pozitivně hodnotím ilustrativní histologické obrázky renálního poškození u všech 12 skupin v experimentální části.

K práci mám následující dotazy:

1. Jaký byl vliv srovnávaných typů antihypertenzní medikace na hodnoty kreatininu u HT krys bez takrolimu?

2. Proč byla zvolena pro definici hypertenze hodnota TK více než 150/90 mm Hg, když v doporučeních pro diagnostiku a léčbu hypertenze je hodnota 140/90 mm Hg?

3. Proč nebyla častěji používaná kombinace ACEi a BVK (blokátor kalciových kanálů)- je v doporučeních jak pro HT, tak pro sledování po OTS). V obr.3a pro skupinu 1 tato dvojkombinace není vůbec uvedena.

4. Čím vysvětlujete, že hodnoty alfa-1-mikroglobulinu v moči byly nejvyšší v době randomizace a v 6 měsíci?


Souhrn hodnocení

Disertační práce MUDr. Lenky Hoškové je originálním výzkumem na vysoce aktuální téma. Je evidentní, že doktorandka je dobře obeznámena s nejnovějšími poznatky v oboru a že v něm také dlouhá leta také pracuje. Patří k významným odborníkům v transplantační kardiologii. Práce vznikla na renomovaném pracovišti s precizně vypracovanou metodikou a pod odborným vedením vysoce erudovaného školitele.

Práci doporučuji k obhajobě podle § 47 zákona o VŠ pro disertační práci.

prof. MUDr. Lenka Špínarová, Ph.D, FESC  
přednostka I. Interní kardiologické kliniky  
FN u sv. Anny a LF MU, Brno

V Brně 17.9.2018

  
FARNÍ  
U SV. ANNY V BRNĚ  
656 91 BRNO, Pekařská 53  
I. interní-kardiologická klinika  
7