

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Hana Marie Dvořáková
(roz. Stuchlíková)

Známky preklinické aterosklerózy u dětí s chronickým onemocněním ledvin

Determinants of premature atherosclerosis in children with end-stage renal disease

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: MUDr. Jan Piřha CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou 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, 10.10.2012

HANA M. DVOŘÁKOVÁ

Poděkování

Na prvním místě bych chtěla poděkovat panu profesoru MUDr. Janu Jandovi, CSc., který mě k myšlence postgraduálního studia vlastně přivedl a umožnil mi výzkum na Pediatrické klinice FN v Motole realizovat. Poděkovala bych ráda také profesoru Tomáši Seemanovi, CSc., jež mi velmi pomohl nejen svými radami a připomínkami, ale umožnil mi také spolupodílet se na jeho práci a učit se, jak propojit vědeckou práci s klinickou praxí pediatra. Stejně tak patří můj dík MUDr. Peteru Szitanyimu, Phd., který mi se svým specifickým smyslem pro humor pomáhal zejména v začátcích mého postgraduálního studia.

Největší díky patří mému školiteli MUDr. Janu Piřhovi, CSc. Umožnil mi učit se na pracovišti Laboratoře pro výzkum aterosklerózy CEM IKEM Praha vyšetřovacími metodám preklinické aterosklerózy a nebál se svěřit zavedení hodnocení výsledků novým počítačovým programem do mých začátečnických rukou. Po celou dobu mého postgraduálního studia vedl a směřoval mou práci. Když jsem posléze zaváděla metodiku vyšetření na Pediatrické klinice v Motole a potýkala se s různými komplikacemi ať technickými či personálními, vždy byl ochotný mi pomoci a vymyslet nové řešení. Zpětně oceňuji také to, že mě přes mou nechuť směřoval k veřejné prezentaci výsledků naší práce, čímž se mi podařilo alespoň částečně překonat trému při vystupování na veřejnosti.

Podpořil mě také v účasti a prezentaci našich výsledků na zahraničním kongrese, stejně jako při absolvování Letní školy European atherosclerosis society. A nezanevřel na mě ani v době mé přechodné pracovní nečinnosti v době mateřské dovolené. Za to vše ještě jednou díky!

Chtěla bych také poděkovat RNDr. Věře Lánské za pomoc při statistickém zpracování údajů a Romaně Dembovské z Laboratoře pro výzkum aterosklerózy, nejen za mravenčí práci při společném hodnocení stovek černobílých obrázků, ale i za pohodu a optimismus, který při práci s ní vždy panuje. Díky patří také vyšetřovaným dětem a jejich rodičům, kteří byli ochotni se studií účastnit, přestože v nemocnicích tráví už tak dost velkou část svého dětství.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům, za vše. A také za jejich přesvědčení, že vědění je důležitější než vlastnění. Děkuji mému manželovi, jehož podpora mi pomáhá v práci i v životě a děkuji své dceři, díky které už nemusím přemýšlet nad smyslem lidského života.

Děkuji vám

Hana M. Dvořáková

Identifikační záznam:

DVOŘÁKOVÁ, Hana Marie. *Známky preklinické aterosklerózy u dětí s chronickým onemocněním ledvin. (Determinants of premature atherosclerosis in children with end stage renal disease)*. Praha 2012, 81s. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Gynekologicko-porodnická klinika, novorozenecké oddělení. Vedoucí práce Piřha, Jan.

OBSAH

Seznam zkratk použitých v textu	2
Úvod	4
Aterogeneze	5
Ateroskleróza v dětství	8
Ateroskleróza při chronické renální insuficienci (CHRI)	
Neinvazivní vyšetřovací metody časných stádií aterosklerózy a jejich využití v dětském věku	15
Historie a princip metod vyšetřování preklinické aterosklerózy ultrazvukem	19
Vyšetřování preklinické aterosklerózy u dětí s CHRI	23
Klinické studie	26
I. Menopauzální přechod zvyšuje aterogenní riziko kouření u žen středního věku (Zavedení metodiky CIMT, studie variability, standardizace metody)	
Hypotéza a cíl studie	27
Metodika	28
Výsledky	31
Diskuze	37
Závěr	39
II. Preklinické známky aterosklerózy u dětí s chronickým onemocněním ledvin	
Hypotéza a cíl studie	40
Metodika	41
Výsledky	45
Diskuze	48
Závěr	52
Proteinurie jako rizikový faktor aterosklerózy	53
III. Snížení proteinurie během intenzivní antihypertenzní léčby u dětí po transplantaci ledviny	
Hypotéza a cíl studie	57
Metodika	58
Výsledky	59
Diskuze	60
Závěr	61
Závěrečná diskuze	62
Souhrn	65
Summary	67
Seznam publikací autora	69
Literatura	71

Seznam zkratk použitých v textu

ESRD	end stage renal disease, konečná fáze selhání ledvin
CIMT	carotis intima-media thickness, tloušťka intimy-medie společné karotidy
CHRI	chronická renální insuficience
TK	arteriální krevní tlak
PDAY	Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth
IUGR	intrauterinní růstová retardace plodu
KVO	kardiovaskulární onemocnění
ICHS	ischemická choroba srdeční
RRT	renal replacement therapy, náhradní léčba funkce ledvin
VLDL	very low density lipoprotein, lipoprotein o velmi nízké hustotě
IDL	intermediate density lipoprotein, lipoprotein o střední hustotě
LDL	low density lipoprotein, lipoprotein o nízké hustotě
HDL	high density lipoprotein, lipoprotein o vysoké hustotě
TAG	triacylglyceroly
HD	hemodialýza
PD	peritoneální dialýza
LPL	lipoproteinová lipáza
SOD	superoxid dismutáza
NAD(P)H	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
UZ	ultrasonografie
EBCT	elektronickým paprskem řízená počítačová tomografie;
NMR	nukleární magnetická rezonance
FMD	flow mediated dilatation, na endotelu závislá dilatace periferních tepen
GFR	glomerulární filtrace
BMI	body mass index
STK	systolický krevní tlak
DTK	diastolický krevní tlak
ABPM	ambulatory blood pressure monitoring
Apo A1	Apolipoprotein A1
Apo B	Apolipoprotein B
LP (a)	Lipoprotein (a)
CRP	C-reaktivní protein

AIP	Aterogenní index plasmy
SVHS	Super Video Home System
ABPM	ambulatory blood pressure monitoring, 24 hodinové ambulantní monitorování krevního tlaku
ACEI	inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu
SD	standart deviation, směrodatná odchylka
SDS	standard deviation score, skóre směrodatné odchylky

Úvod

Kardiovaskulární onemocnění, i přes pokles jejich výskytu v posledních desetiletích, představují stále nejčastější příčinu úmrtí v evropských zemích včetně České republiky. Ačkoliv ke klinické manifestaci kardiovaskulárního onemocnění na podkladě aterosklerózy dochází mnohem později, víme dnes, že aterosklerotický proces začíná již v dětství, velmi pravděpodobně dokonce již ve fetálním období. Kromě toho existují skupiny dětí, u kterých je v rámci jiného závažného onemocnění aterosklerotický proces výrazně akcentován.

Jednou z nejvíce ohrožených skupin jsou děti s postižením ledvin; rizikové faktory srdečně cévních onemocnění mohou být navíc u této skupiny odlišné než u běžné dětské populace či u dětí s vrozenými poruchami metabolismu lipidů. Proto je z hlediska prevence a terapie aterosklerózy důležité zjistit další možné rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění, nejen u dětí s vrozenými vadami metabolismu lipidů ale i u dětí s ledvinovým postižením. Komplikujícím faktorem pro studie v dětském věku je relativně nízký počet nemocných dětí a soubory pacientů jsou tak oproti pracem zabývajícím se dospělými pacienty významně menší. Velkou výhodou dětského věku pro zkoumání rizikových faktorů aterosklerózy je naopak minimální přítomnost komorbidit a klasických rizikových faktorů- diabetu, kouření a obezity, které mohou mást výsledky studií v dospělé populaci. Proto se domníváme, že i tyto relativně malé studie mají smysl a mohou napomoci v poznání příčin onemocnění.

Zároveň některé, u dospělých pacientů běžné vyšetřovací metody není vhodné v dětském věku použít, ať už pro jejich velkou zátěž pro vyvíjející se organismus (například radiační u výpočetní tomografie) či obtížnou spolupráci obzvláště u malých dětí- jak se ukázalo i během naší studie.

Pokusili jsme se stanovit neinvazivní možnosti detekce časných aterosklerotických změn v tepenné stěně použitelné v dětském věku a jejich pomocí ozřejmit rizikové faktory předčasného rozvoje kardiovaskulárního onemocnění u vysoce rizikové skupiny dětí v konečné fázi renálního selhání.

Aterogeneze

Proces aterogeneze dnes chápeme na podkladě kombinace lipidové hypotézy a Rossovy teorie poškození endotelu. V důsledku řady inzultů mechanických, chemických, infekčních a zánětlivých dochází k narušení funkce (endoteliální dysfunkce) a následně k morfologickým změnám (aterosklerotická léze) ve stěně tepen. Aterogeneze je komplikovaný proces podmíněný řadou patofyziologických dějů zahrnujících akumulaci extracelulárních lipidů, vznik a zánik pěnových buněk, přestavbu a redukci strukturální extracelulární matrix a hladkých svalových buněk, vznik minerálních depozit, chronický zánět, porušení kontinuity povrchu léze, vznik a organizaci hematomu, vznik trombózy a fibromuskulární tkáně.

Při vzniku a progresi aterosklerotické léze může jeden nebo několik těchto procesů převládat, nebo naopak chybět, v pozdějších fázích vývoje aterosklerózy probíhají často tyto procesy synchronně (Stary HC., 2000).

Endotelová dysfunkce

Dle současných poznatků dochází nejprve k narušení funkcí arteriální intimy, především její endotelové vrstvy- endotelové dysfunkci. Buňky endotelu mají fyziologicky vysokou sekreční a metabolickou aktivitu, podílí se mimo jiné na transportu buněk a molekul mezi krví a okolním intersticiem, na regulaci cévního tonu, kontrole hemostázy, fibrinolýzy a migraci a proliferaci buněk vaskulární hladké svaloviny. Cílem všech těchto funkcí je udržení vaskulární homeostázy- adekvátního krevního průtoku, permeability, antitrombotického a antikoagulačního stavu cév. Endotelová dysfunkce je dlouhodobá porucha této rovnováhy, která naopak vede ke zvýšené vaskulární permeabilitě, trombogenní pohotovosti a převaze mitogenních a vazokonstrikčních pochodů v cévní stěně (Mráz M., et al., 2004; Widlansky ME., et al., 2003). Vzniká v důsledku působení různých nox, mezi které můžeme zařadit jak hlavní rizikové faktory aterosklerózy (hypertenze, diabetes mellitus 2. typu, dyslipidemie, nikotinismus, obezita), tak celou řadu dalších patologických stavů (onemocnění ledvin, vaskulitidy, působení toxinů a léků, infekce a řada dalších). Endotelová dysfunkce předchází samotnému morfologickému poškození cévní stěny a podobně jako jeho časná stadia může být reverzibilní.

Histologická klasifikace aterosklerotických lezí

Na podkladě řady experimentálních a především patologických studií vytvořili Stary a kolektiv klasifikaci Americké kardiologické společnosti (American Heart Association),

rozdělující aterosklerotické léze do 8 typů dle morfologických nálezů (Stary HC., et al., 1994; Stary HC., et al., 2000).

Autoři zastávají teorii „adaptivního“ ztluštění intimy v místech zvýšených mechanických sil v cévním stromu, především v oblasti větvení cév. Toto adaptivní ztluštění považují za fyziologický jev, jehož cílem je zachovat optimální průtok rovnoměrně v celém průběhu cévy. Předpokládají, že tloušťka intimy je v různých místech cévního řečiště přirozeně rozdílná. Toto adaptivní ztlušťování začíná již ve fetálním období a v různé míře je nalézáno u všech lidí již při narození. Zároveň je to však místo zvýšeného působení faktorů poškozujících intimu a tedy predisponující pro její patologické ztlušťování a rozvoj aterosklerotických lézí (atherosclerosis-prone regions) (Stary HC., et al., 1992). Z tohoto důvodu tedy Stary a spolupracovníci pokládají toto fyziologické adaptivní ztluštění zároveň za proaterogenní.

Dalším negativním faktorem je narušení lineárního toku krve v místě větvení cév a snížení smykového napětí (shear stress), v důsledku čehož jsou částice cirkulující v plazmě v delším kontaktu s lumenálním povrchem endoteliálních buněk a může snadněji docházet k jejich prostupu do cévní stěny.

Histologicky lze odlišit osm různých typů (stádií) aterosklerotických lézí, které v sebe mohou obousměrně přecházet (Obr 1):

Typ I- iniciální léze

takzvané minimální změny neviditelné pouhým okem, detekují se chemicky.

Mikroskopicky je možno nalézt malé izolované skupinky makrofágů naplněných lipidovými kapičkami (pěnové buňky). Není narušena normální struktura mezibuněčné hmoty a uspořádání buněk intimy.

Typ II- tukové proužky (fatty streaks)

Jsou viditelné pouhým okem. Nacházíme v nich větší množství makrofágů, pěnových buněk a to i v hlubších vrstvách intimy a kapénky tuku jsou přítomny i v hladkých svalových buňkách. Zcela převládá intracelulární akumulace lipidů.

Typ III-preaterom

je přechodné stadium mezi časnými a pokročilými lézemi. Zvyšuje se množství pěnových buněk a tuk je prokazatelný ve velkém množství v hladkých svalových buňkách.

Extracelulární tuk je uložen ve shlucích pod nahromaděnými makrofágy, hromadí se modifikované aterogenní lipoproteiny. Na rozdíl od prvních 2 typů se zvyšuje obsah volného cholesterolu, triglyceridů, fosfolipidů, a sfingomyelinu, ubývá elastinu.

Jakmile se jednotlivé rozptýlené tukové hmoty spojí a vytvoří lipidové jádro léze (core), nazýváme tuto lézi typem IV.

Typ IV- aterom

V tomto stadiu jsou již téměř vždy součástí lipidového jádra také krystalky cholesterolu a drobná depozita kalcia.

Typy IV a V obsahují lipidové jádro, ale liší se původem a tedy vlastnostmi fibromuskulární vrstvy, která lipidové jádro kryje na luminální straně plátu (čepička plátu).

Typ IV- v ateromovém plátu přibývají extracelulární lipidy. Čepička je tvořena pouze preexistující intimou, jejíž tloušťka je v místech zvýšené citlivosti (atherosclerosis-prone regions) v důsledku adaptivního ztlušťování intimy relativně větší. Díky tomu se může tloušťka čepičky v závislosti na lokalizaci plátu v tepenném stromu mírně lišit. Histologické složení čepičky v lezích typu IV je stejné jako u normální intimy a stupeň zúžení cévního lumen je dán množstvím lipidů akumulovaných v jádru léze. U většiny lidí tento typ plátu obturuje lumen minimálně, protože v této fázi dochází k vyklenování ztluštělé části cévní stěny směrem ven.

Typ V

naopak u tohoto typu léze je převážná část fibromuskulární čepičky tvořena tkání nahrazující a převrstvující původní normální intimu, obsahuje větší množství hladkých svalových buněk. Buňky nejsou uspořádány stejně jako v normální intimě (včetně intimy ztluštělé v důsledku adaptace v atherosclerosis-prone regions) a fibromuskulární čepička obsahuje větší množství kolagenních vláken. Nově vznikající vrstvy způsobují progresi plátu směrem do lumina cévy a její zužování.

Typ VI- komplikovaný plát

jeden nebo více defektů povrchu plátu, hematom, trombóza. Tyto tři procesy spolu úzce souvisí, nemusí být vždy přítomny všechny.

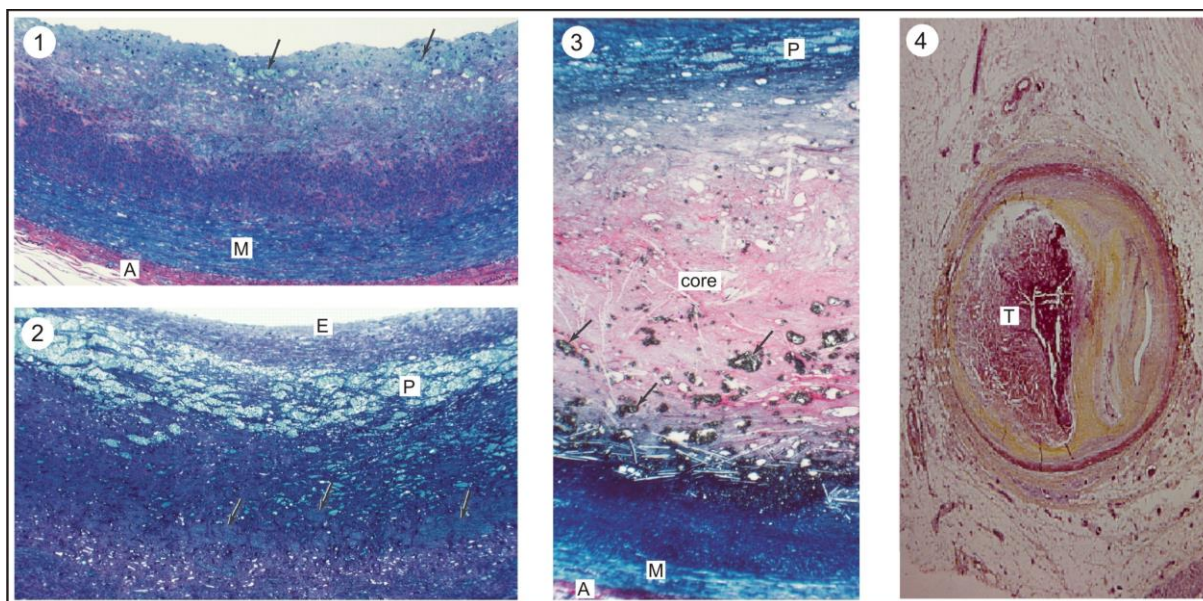
Typ VII

dříve označován jako typ Vb- převládá kalcifikace.

Typ VIII

dříve označován jako typ Vc- převládá fibrotizace.

Obř 1. Histologický obraz některých typů (stádií) aterosklerotických lézí



(1) léze Typ II: šipky- tukovými kapénkami naplněné buňky, M- media, A- adventicia. (2) léze Typ III: šipky- extracelulární tuk hromadí se v hlubokých vrstvách intimy, P- pěnové buňky, E- vrstva endoteliálních buněk. (3) léze Typ IV: extracelulární tukové hmoty obsahující krystalky cholesterolu a kalcia (šipky) tvořící jádro ateromu (core). (4) léze Typ VI komplikovaný plát, T- trombus (převzato z Stary HC, 2000).

Ateroskleróza v dětství

Je již všeobecně známo, že proces aterosklerózy začíná v dětství, postupně progreduje a v závislosti na přítomnosti rizikových faktorů se začíná klinicky projevovat v dospělosti až stáří. Přínosem v této oblasti byly především velké multicentrické studie zahrnující všechny věkové kategorie, díky kterým byl prokázán výskyt tukových proužků (fatty streaks) již u dětí mladších než 3 roky (Berenson GS., 2002). U všech 204 dětí zemřelých náhle většinou v důsledku úrazu ve věku 2-15 let sledovaných v rámci Bogalusa heart study byly v aortě nalezeny tukové proužky, u čtvrtiny z nich i pokročilejší stadia aterosklerotických lézí. U zhruba poloviny z těchto dětí byly nalezeny tukové proužky a u 8% i fibrózní pláty také v koronárních artériích (Šamánek M., Urbanová Z., 2003). V rámci studie PDAY (Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth) bylo vyšetřeno asi 350 dětí ve věku 15-19 let rovněž zemřelých v důsledku traumatu, u všech byly nalezeny tukové proužky a ve 4-14% pak i fibrózní pláty v aortě. V pravé koronární artérii pak byly tukové proužky přítomny asi v 50% a fibrózní pláty u 8-15% vyšetřovaných osob (Stroby JP., et al., 1993).

V poslední době byly prezentovány práce prokazující výskyt lézí I. typu již v novorozeneckém a dokonce fetálním období (Napoli C., et al., 1999; Stary HC., 2000;

Aschermann M., Linhart A., 2007). Především u plodů matek s hypercholesterolemií byly nalezeny tukové proužky ve stěně aorty i koronárních cév (Napoli C., et al., 1997; Berenson GS., 2002; Palinski W., Napoli C., 2002). Překvapením bylo zjištění, že v postnatálním období je výskyt těchto lézí nejvyšší v období prvních 6 měsíců života, avšak následně dochází k jejich regresi a jejich incidence znovu pomalu stoupá po druhém roce života (Napoli C, et al., 1999; Stary HC., 2000). Jak již bylo řečeno, absolutní velikost aterosklerotických lézí byla prokázána nejvyšší u plodů matek s trvalou hypercholesterolemií. Vzhledem k tomu, že v experimentech bylo zjištěno, že životnost pěnových buněk je zhruba 6 měsíců, je možné, že změny typu I které nacházíme v prvních měsících života vznikly již in utero a odrážejí rizikové faktory matky. Změny nalézané později v dětství jsou pak již obrazem vlastních genetických a jiných rizikových faktorů dítěte.

Představu, že již v prenatálním období dochází k nastavení (programingu) metabolických pochodů pro budoucí postnatální život podporují i práce zabývající se studiem intrauterinní růstové retardace plodu (IUGR) jako rizikového faktoru kardiovaskulárních onemocnění (KVO) (Szitányi P., et al., 2008; Leeson CPM., et al., 1997; Barker DJP., 1995). Tyto studie naznačují, že intrauterinní malnutrice může způsobit dlouhodobé změny vaskulární funkce, které se manifestují později v životě a mohou ovlivňovat dlouhodobé riziko kardiovaskulárního onemocnění (Szitányi P., et al., 2003).

Víme tedy, že aterosklerotický proces začíná v časném dětství- pravděpodobně již in utero a inaparentně progreduje desítky let než se projeví klinicky. U dětí nalézáme iniciální léze a tukové proužky, v období puberty- především ve druhé polovině druhé dekády života- přibývá pokročilejších lézí charakteru fibrózních plátů. Za normálních okolností se další stupně aterosklerózy (především komplikované pláty) v dětském věku nevyskytují. Avšak u dětí s některými závažnými onemocněními je proces aterosklerózy extrémně akcentován.

Ateroskleróza při chronické renální insuficienci

Děti s chronickou renální insuficiencí (CHRI), především v jejich konečných stádiích vyžadující léčbu nahrazující funkce ledvin (RRT- renal replacement therapy), jsou stejně jako pacienti s dalšími závažnými diagnózami, jako je homozygotní forma familiární hypercholesterolemie, diabetes mellitus 1. typu, recipienti transplantace srdce nebo děti s Kawasakiho chorobou a aneurysmaty, již v dětském věku řazeni do kategorie nejvyššího rizika rozvoje časně aterosklerózy. Pediatrická sekce American Heart Association řadí pacienty s těmito diagnózami do nejrizikovější skupiny I, tedy s předpokladem rozvoje

manifestního kardiovaskulárního onemocnění před třicátým rokem života (Kavey RV., et al., 2006). Parekh et al. analyzovali data 1380 pacientů, kteří byli od dětského věku léčeni RRT a zemřeli před 30 rokem života. U 23 % z nich byla prokázána kardiovaskulární příčina úmrtí. Je známo, že riziko úmrtí na KVO je u pacientů v konečném stádiu selhání ledvin (ESRD- end stage renal disease) 20-30 násobné oproti běžné populaci, takže u těchto pacientů ve věku 25 let je riziko úmrtí na KVO téměř stejné jako u běžné populace ve věku kolem 75-80 let (Querfeld U., 2002; Oh J. et al., 2002). K významnému snížení rizika dochází po úspěšné transplantaci ledviny, i tak je však minimálně dvojnásobné oproti věkově přiměřené populaci (Querfeld U., 2002; Sarnak MJ., et al., 2003; Parekh RS., et al., 2002) a očekávaná délka života je kratší o 20-25 let (Wilson AC., Mitsnefes MM., 2009). Snížení kardiovaskulárního rizika je přičítáno jednak odstranění hemodynamických a uremických abnormalit spojených s dialýzou a určitý význam zřejmě má i jen samotný výběr příjemců transplantované ledviny (pacienti bez těžkých komorbidit a komplikací). V současné době probíhají četné diskuze ve snaze prokázat příčinu extrémní akcelerace aterosklerotického procesu u osob v CHRI. Předpokládá se, že u dětí stejně jako u dospělých s chronickým onemocněním ledvin, jde o kombinaci tradičních rizikových faktorů aterosklerózy jako je hypertenze (49% CHRI, 60% dialyzovaných, 80% transplantovaných), diabetes či dyslipidemie, které se u pacientů s CHRI velmi často kombinují a specifických tzv. „uremických“ rizikových faktorů (Kavey RV, et al., 2006; Seeman T., et al. 2004; Wilson AC., Mitsnefes MM., 2009) (Tab 1).

U většiny dospělých pacientů, kteří dospějí do konečného stadia selhání ledvin je příčinou buď diabetická nefropatie či generalizovaná ateroskleróza. Přítomnost jak klasických, tak uremických rizikových faktorů KVO je v této skupině pacientů vysoká a již na počátku CHRI je většinou kardiovaskulární onemocnění rozvinuto. Oproti tomu u dětských pacientů na počátku RRT v naprosté většině nebývá symptomatická ateroskleróza či diabetes přítomen, přesto však bohužel sdílejí stejně vysoký stupeň rizika rozvoje KVO jako dospělí pacienti s CHRI.

Tab 1. Klíčové rizikové faktory kardiovaskulárního onemocnění u dětí s chronickým onemocněním ledvin a jejich význam po transplantaci ledviny

Rizikový faktor	Prevalence	Vliv úspěšné transplantace ledviny (tx)
Hypertenze	48-87%	Zvyšuje se na 80-90% za 1 rok po tx
Dyslipidemie	50-90%	Více po tx, iatrogenní
Obezita	10-30%	Zdvojnásobení za 1 rok po tx
Abnormální metabolismus glukózy	do 30%	Sledováno většinou jen po tx
Sedavý životní styl	téměř 100%	Nezlepšuje se po tx
Mnohočetná rizika	66%	Zvýšení po tx
Anemie	18-86%	Více po tx (ač se předpokládal opak)
Hyperparathyroidismus	30-60%	Zlepšení po tx

Převzato a přeloženo z Wilson and Mitsnefes (Wilson AC., Mitsnefes MM., 2009)

Není pochyb o tom, že u pacientů podstupujících RRT hrají důležitou úlohu specifické rizikové faktory s touto léčbou související, jako je chronický zánět (katetrové vstupy, „leak“ dialyzátu, chronické či recidivující infekce při imunosupresi), nebo agresivní farmakoterapie (kortikoidy, imunosupresiva).

Pravděpodobně dochází i k přímému poškozování cévního endotelu hromadícími se toxickými produkty metabolismu při uremii. Významný může být i iatrogenní rizikový faktor- léčba renální osteodystrofie kalciovými vazači fosfátů a vitamínem D, v jehož důsledku může docházet k rozvoji adynamické kostní choroby a ektopickým kalcifikacím včetně kalcifikace cév (Querfeld U., 2002).

Dyslipidemie u CHRI

Jasno zatím není ani v otázce uremické dyslipidemie. Její prevalence u dětí s CHRI je 50-90% (Wilson AC., Mitsnefes MM., 2009). Nejvyšší hodnoty jsou přítomny u dětí po úspěšné renální transplantaci, avšak již u pacientů s CHRI ve stadiu 2-4 je hypertriglyceridemie častá (31%), následovaná hypercholesterolemií (13%) a nízkým HDL cholesterolem (high density lipoprotein) (8%) (Saland JM., et al., 2010). Spektrum poruch lipidového metabolismu je u pacientů s CHRI odlišné od dyslipidemie běžné populace. Na základě recentních studií, které došly ke shodným závěrům, můžeme považovat za prokázané některé charakteristické odchylky pro poruchy lipidů u dospělých pacientů s CHRI. Je to především zvýšená koncentrace VLDL (very low density lipoproteins),

chylomikronů a IDL (intermediate density lipoproteins) remnantů (Wanner C., Quaschning T., 2001; Saland JM., Ginsberg HN., 2007; Kaysen GA., 2009), zvýšení triacylglycerolů a nízký HDL cholesterol (Kwan BC., et al., 2007; Ritz E., Wanner C., 2008; Attman PO., Samuelsson O., 2009; Piecha G., et al., 2009).

Zvýšení triacylglycerolů je nalézáno u 70% pacientů s CHRI, po zahájení hemodialýzy (HD) dochází k částečné úpravě hypertriglyceridémie, minimálně u nediabetických pacientů (Mesquita J., et al., 2010). Oproti tomu pacienti léčení peritoneální dialýzou (PD) vykazují nárůst hypercholesterolemie ve srovnání s pacienty v predialyzačním stadiu či léčenými HD v důsledku nárůstu hladin celkového a LDL cholesterolu. Rovněž po úspěšné transplantaci ledviny a normalizaci renálních funkcí porucha lipidového metabolismu přetrvává, vykazuje však jiné odchylky, vázané na typ imunoprese (inhibitory kalcineurinu, antiproliferativní léky (mykofenolát mofetil a azatioprin), rapamycin a kortikosteroidy). Nejčastějšími změnami v lipidovém spektru příjemců ledviny bývá zvýšený celkový cholesterol, LDL cholesterol, triacylglyceroly (TAG), a snížený HDL cholesterol.

Je tedy zjevné, že už jen v závislosti na typu RRT či stadiu CHRI může být porucha lipidového metabolismu různá, což značně přispívá k nejasnostem stran příčin, prevence a léčby dyslipidemie spojené s renálním onemocněním.

Změny enzymatické aktivity

Velmi pravděpodobně se jedná o komplexní poruchu jejichž příčin je celá řada. Starší práce vysvětlují uremickou dyslipidemii sníženou degradací lipidových částic obsahujících apolipoprotein B (Querfeld U., 1993; Kronenberg F., et al., 1996; Attman PO., et al., 1997). V recentních pracích začíná být za jeden z hlavních mechanismů zvýšení na triacylglyceroly bohatých lipoproteinů (VLDL, LDL, IDL, chylomikronů) považována snížená aktivita hlavních lipáz cévního endotelu- lipoproteinové lipázy (LPL) a hepatální lipázy (HL) (Mesquita J., et al., 2010). Snížení jejich lipolytické aktivity může být mimo jiné způsobeno také zvýšenou přítomností jejich inhibitorů v cirkulaci. Jedním z nich se jeví být například apolipoprotein Apo-CIII, který ovlivňuje vazbu lipoproteinů na jejich receptory a zároveň je silným inhibitorem LPL.

U většiny pacientů s CHRI bývá snížena hladina HDL cholesterolu a Apo A1. Nadbytek TAG v cirkulaci zvyšuje jejich přesun na HDL, které se tak ve zvýšené míře stávají substrátem jaterní lipázy za vzniku malých denzních HDL. Snížená je rovněž aktivita enzymu lecitín-cholesterol acyl transferázy a tím snížený příjem esterifikovaného

cholesterolu HDL lipoproteiny, čímž dochází k opožděné maturaci HDL (Quaschnig T., 2001; Piecha G., 2009). U pacientů s chronickým selháním ledvin v jeho konečné fázi dochází rovněž ke snížení enzymu paraoxonázy nesené HDL částicemi (Kwan BC., 2007; Kaysen GA., 2009), čímž u dialyzovaných pacientů dochází ke snížení antioxidační kapacity HDL (Kaysen GA., 2009).

Strukturální změny Lipoproteinů

Dochází také ke změnám ve struktuře lipoproteinů. V souvislosti s uremickým prozánětlivým stavem dochází k inkorporaci sérového amyloidu A do HDL částic, které se tím mění na tzv. zánětlivé HDL či HDL akutní fáze, jež přestávají být protektivní a stávají se naopak pro-aterogenními (Wanner C., Quaschnig T., 2001; Ritz E., Wanner C., 2008). Navíc se snižuje kapacita HDL k transportu cholesterolu. Změněný katabolismus lipoproteinů, jak byl popsán výše vede ke vzniku a kumulaci různých remnantů na triacylglyceridy bohatých částic, které jsou značně heterogenní co do velikosti, složení i stupně aterogenicity. Jak již bylo řečeno, zvýšená koncentrace triacylglycerolů vede k jejich zvýšenému přesunu na HDL a také LDL výměnou za esterifikovaný cholesterol a to působením enzymu cholesteryl ester transfer protein. Tak, ačkoli hladina LDL cholesterolu může být normální či dokonce snižená, stávají se LDL částice menšími a denznějšími než normálně v důsledku zvýšení prekurzorů VLDL a výměně TAG za esterifikovaný cholesterol, následovaný lipolýzou TAG (Saland JM., Ginsberg HN., 2007; Kaysen GA., 2009).

Pro tuto velkou heterogenitu a měnlivost poruch lipidového metabolismu u CHRI se dokonce část autorů domnívá že žádná specifická dyslipidemie u CHRI vlastně neexistuje (Querfeld U., 2002; Groothoff JW., et al., 2005). Faktem je, že v řadě studií nebyla u pacientů s CHRI prokázána korelace mezi úmrtím z kardiální příčiny a hyperlipidemií, ačkoli je u nich lipidový profil jasně aterogenní. Byla rovněž vyslovena teorie, že aterogenní potenciál dyslipidemie u CHRI může být více závislý na abnormitách apoproteinů než lipidů samotných a tak není možno vždy tyto odchylky diagnostikovat vyšetřením pouze samotných plazmatických lipidů (Kwan, BC, et al., 2007). Je zde také řada matoucích faktorů, například malnutrice asociovaná s nízkými hladinami cholesterolu u pacientů v CHRI a podobně (Ritz E., 1996).

Oxidační stress a CHRI

Oxidační stres se ukazuje být konstantní součástí chronického renálního onemocnění, jehož přesný mechanismus zůstává zatím neznámý (Vaziri ND., 2004). Jeho zvýšenou přítomnost je možno prokázat nadbytkem produktů vznikajících oxidací proteinů, lipidů a uhlovodíků v plazmě a tkáních uremických osob. Superoxid je primární volný kyslíkový radikál produkovaný organismem, jeho hlavním producentem je nikotinamid adenin dinukleotid fosfát oxidáza (NAD(P)H oxidáza. Hlavním enzymem zodpovědným za jeho odstraňování je superoxiddismutáza (SOD). V animálních studiích u krys s CHRI bylo prokázáno, že v důsledku oxidačního stresu dochází k up-regulaci superoxid-produkujícího enzymu NAD(P)H oxidázy a naopak down-regulaci superoxid dismutázy (SOD) (Vaziri ND., et al., 2003). Oxidativní stres hraje rovněž důležitou roli v patogenezi s CHRI asociovanou hypertenzí (oxidace oxidu dusnatého a arachidonové kyseliny a remodelace cévní stěny), zánětu (aktivace nukleárního faktoru Kappa B) i oxidacích lipoproteinů a dalších biologických substrátů.

CHRI navozený oxidativní stres je dále zvyšován současnou přítomností diabetu, hypertenze a autoimunitních onemocnění, jež nezávisle dále zvyšují produkci kyslíkových i dusíkových radikálů. Dalším přídatným faktorem může být také limitovaná konzumace čerstvého ovoce a zeleniny, z důvodů restrikce draslíku u osob s renálním selháním, které obsahují přirozené antioxidační vitamíny.

Proteinurie a CHRI

Proteinurie, definovaná jako exkrece proteinů do moči větší než 300mg/den (u dětí > 100-200mg/m²/den), je známkou perzistující dysfunkce glomerulární bariéry a často předchází zachytitelným známkám poklesu filtrační schopnosti ledvin. Proteinurie se proto stala nejen zásadním prognostickým markerem, ale její snížení rovněž terapeutickým cílem v kardiiovaskulární medicíně (Seeman T., et al. 2007; Sarnak MJ., Astor BC., 2011). U dospělých pacientů bylo provedeno rozsáhlé review 39 studií s 1 371 990 nedialyzovaných pacientů s chronickým onemocněním ledvin, jež našlo souvislost mezi chronickou renální insuficiencí (CHRI) a vysokým rizikem jak celkové tak kardiiovaskulární mortality nezávisle na rozdílech v designu studie, studované populaci či definici CHRI (Tonelli M., et al., 2006). Navíc bylo zjištěno, že pacienti s chronickým renálním onemocněním vykazují vyšší

riziko kardiovaskulárního úmrtí než progresi do konečného stadia renálního selhání. V jiné rozsáhlé studii s 27 998 účastníky s CHRI (glomerulární filtrace 15-90 ml/min/1.73m²) byla mortalita 24.9%, zatímco jen 3.1% pacientů dospěla do ESRD (Keith DS., et al., 2004). Tyto nálezy ukazují, že většina dospělých pacientů s CHRI zemře na kardiovaskulární onemocnění dříve než dospěje do ESRD. Proteinurie je jasně asociována se zvýšeným rizikem kardiovaskulární morbidity a mortality. Toto riziko je u pacientů s proteinurií dále zvyšováno přítomností dalších klasických i netradičních kardiovaskulárních rizikových faktorů. A opačně, přítomnost proteinurie urychluje progresi CHRI, čímž opět zvyšuje kardiovaskulární rizika.

Neinvasivní vyšetřovací metody časných stádií aterosklerózy a jejich využití v dětském věku

S poznáním, že aterosklerotický proces začíná jako endotelová dysfunkce a pozvolné ztlušťování intimální vrstvy cévní stěny, vznikla snaha najít metody, kterými by bylo možno detekovat známky aterosklerotického poškození již v tomto časném preklinickém stadiu. Nejen pro výzkumné účely, ale i v klinické praxi našly uplatnění především 3 metody: dopplerovská ultrasonografie (UZ), nukleární magnetická rezonance (NMR) a počítačová tomografie (CT) (Stuchlíková H., 2005).

Elektronovým paprskem řízená počítačová tomografie (EBCT- electron beam computed tomography) se v diagnostice aterosklerotického poškození používá ke stanovení "kalciového skóre" koronárních tepen bez použití kontrastní látky (Obr 2). Poprvé toto vyšetření uvedl Agatston, po kterém bývá někdy pojmenováno jako Agatstonovo kalciové skóre (Agatston AS., et al., 1990). Kalciové skóre vyjadřuje riziko ischemické choroby srdeční (ICHS) a může být využito jako komplementární vyšetření k dalším rizikovým faktorům. Jedná se o statistické vyjádření rizika a neplatí přímá úměra, že v nejlépe kalcifikovaném místě bude nejtěsnější stenóza (Tab 2).

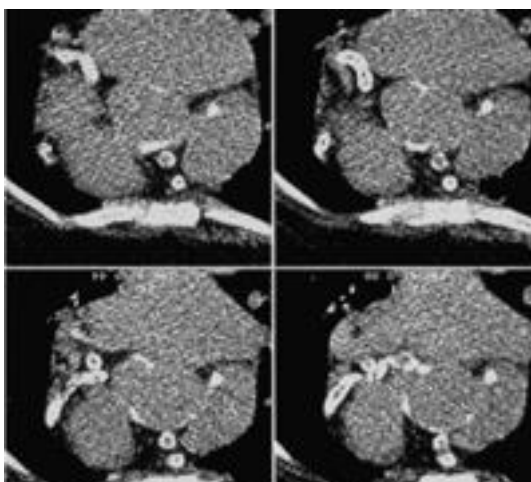
Tab 2. Interpretace výsledků kalciového skóre u asymptomatických pacientů.

Kalciové skóre	Kalcifikované pláty	Pravděpodobnost významného postižení koronárních tepen	Dopad na KV riziko
0	Bez detekovatelných plátů	Velmi nízké, <5%	Velmi nízký
1-10	Velmi málo detekovatelných plátů	Velmi nepravděpodobné <10%	Nízký
11-100	Lehké postižení	Nízká pravděpodobnost	Střední
101-400	Střední postižení	Střední pravděpodobnost	Větší
>400	Rozsáhlé postižení	Vysoká pravděpod. nejméně 1 významné stenózy >90%	Velký

KV- kardiiovaskulární. (převzato z Adla T., 2009)

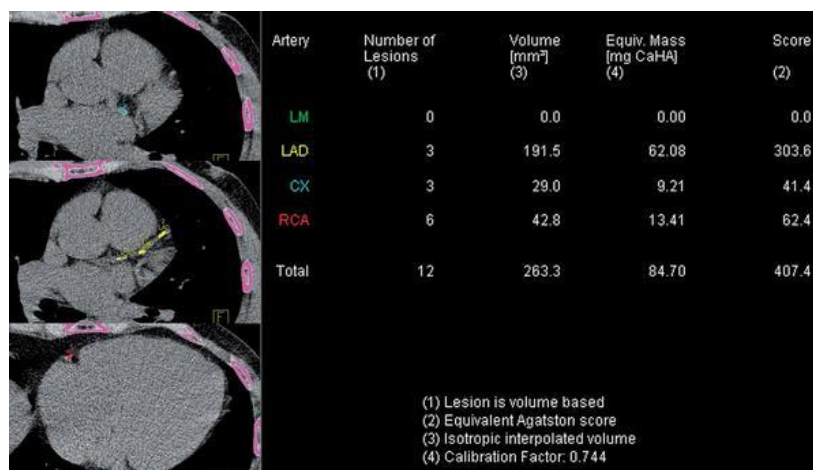
Vlastní měření je realizováno za pomoci speciálního programu, kde jsou manuálně lékařem či školeným personálem označeny kalcifikace v koronárních tepnách a pomocí výpočtu na velikosti kalcifikací a jejich denzitě je vypočítáno kalciové skóre a další související hodnoty (Obr 3).

Obr 2. EBCT- výrazná kalcifikace všech tří koronárních artérií



Převzato z Haydar AA., et al., 2004

Obr 3. Měření kalciového skóre koronárních tepen.



Program vše, co pokládá za kalcifikace (denzita nad 130 Hounsfieldových jednotek), označí barevně (fialově). Manuálně jsou pak označeny jednotlivé kalcifikace v koronárních tepnách. Program vypočítá hodnoty kalciového skóre celkově a pro jednotlivé tepny (převzato z Adla T., 2009)

Předností této metody je přímé zobrazení koronárních tepen a dobrá reprodukovatelnost vyšetření, jež navíc není výrazněji závislé na tělesné stavbě vyšetřovaného. Jak je však zřejmé i z obrázku, hodnotí EBCT až pozdější stadia aterosklerotického postižení.

Neukazuje stupeň tepenné obstrukce a není schopné detekovat nestabilní/vulnerabilní aterosklerotické pláty. Nezanedbatelnou nevýhodou, především pokud uvažujeme o dětských pacientech, je pak vysoká radiační zátěž. Efektivní dávka radiačního záření při vyšetření EBCT (cca 2 mSv – v závislosti na použitém přístroji a vyšetřovacím protokolu) je přibližně 80 násobek efektivní dávky při běžném rentgenovém snímku hrudníku (Adla T., 2009).

Oproti tomu při vyšetření NMR, jež je jednou z nejmodernějších zobrazovacích metod v oblasti koronárních i periferně uložených tepen, riziko radiační zátěže odpadá.

Tato metoda umožňuje dokonalé zobrazení cévní stěny a především kvality plátů (Toussaint JF, 1996). Zvláště složení plátu může magnetická resonance zobrazit lépe než sonografické metody. Současné přístroje dokonce umožňují zobrazení vasa vasorum prorůstajících do aterosklerotických plátů které hrají roli v jejich destabilizaci.

Nevýhodou je vysoká cena a obtížná dostupnost vyšetření. Navíc změny v tepenné stěně, které je možné vyšetřením NMR prokázat, jsou rovněž pokročilejšího typu a v dětském věku se vyskytují ojediněle. Velkou nevýhodou je také, stejně jako u CT, nezbytnost celkové anestézie při vyšetření malých dětí.

V dohledné době není pravděpodobné, že by tato vyšetření začala být rutinně využívána v diagnostice časných aterosklerotických změn v dětské populaci.

V neposlední řadě jsou k vyšetřování preklinického aterosklerotického postižení využívány ultrasonografické metody (UZ). Jejich nespornými výhodami jsou především neinvazivita a minimální zátěž pro pacienta umožňující jejich časté a opakované použití. V porovnání s výše zmiňovanými metodami jako je NMR či CT jde rovněž o metodu poměrně levnou a všeobecně dostupnou (Tab 3).

Tab 3. Přehled metod vyšetření aterosklerózy v preklinickém stádiu v dětském věku

Metoda	Výhody	Nevýhody
<i>EBCT</i>	Neinvazivita Relativní jednoduchost Standardizace Nezávislost na tělesné stavbě	Radiační zátěž Nutnost celkové anestézie u menších dětí Pozdní stadia aterosklerotického procesu Vysoká cena Menší dostupnost
<i>NMR</i>	Neinvazivita Relativní jednoduchost Standardizace Nezávislost na tělesné stavbě	Nutnost celkové anestézie u menších dětí Vysoká cena Malá dostupnost Kontraindikace při přítomnosti magnetického cizího materiálu v těle
<i>UZ-funkční vyšetření endoteliální dysfunkce</i>	Záchyt v nejčasnějším stadiu Nízká cena Neinvazivita Minimální zátěž	Zkušenost vyšetřujícího Chybí standardizace Vysoká variabilita u 1 pacienta během několika dní
<i>UZ-morfologie IMT-intima media thickness</i>	Dostupnost Neinvazivita Minimální zátěž Relat. nízká cena	Zkušenost vyšetřujícího Pouze periferní tepny Standardizace

(EBCT- Elektronickým paprskem řízená počítačová tomografie; NMR- Nukleární magnetická rezonance; UZ- Ultrasonografie)

Největší pozornosti a dnes částečně i praktického využití dosáhly především dvě ultrasonografické metody: měření tloušťky komplexu intima-media (intima media thickness (IMT)) nejčastěji karotických (CIMT) ale i jiných (femorálních) tepen a měření na endotelu závislé dilatace periferních artérií (flow mediated dilatation (FMD)) (Piřha J., et al., 2001; Stuchlíková H., et al., 2005).

Historie a princip metod vyšetřování preklinické aterosklerózy ultrazvukem

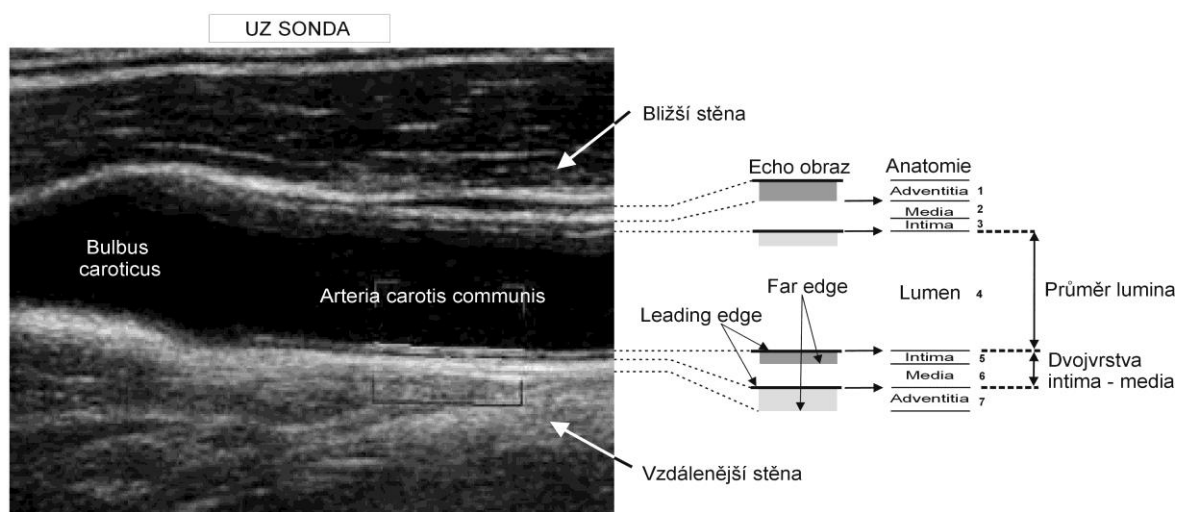
Intima media thickness IMT

Zpočátku snaha vyšetřovat aterosklerotické postižení cév ultrazvukem selhávala především při vyšetřování jejich časných stadií. Byly proměřovány různé parametry a části tepen a jejich stěn, experimentální práce však ukazovaly nízkou korelaci mezi výsledky sonografických vyšetření a skutečnými morfologickými nálezy. V roce 1986 publikoval Pignoli svou práci, ve které prokázal, že ultrazvukové měření společné tloušťky dvojvrstvy intima-media na vzdálenější stěně karotické tepny přesně odpovídá morfologickým nálezům a měřením pomocí mikroskopu (Pignoli P., et al., 1986). Následně bylo toto zjištění potvrzeno celou řadou dalších experimentálních studií různých autorů (Wong M., et al., 1993; Persson J., et al. 1994). Určitou dobu nebylo ještě jasno v otázce měření IMT na k vyšetřovací sondě bližší či vzdálenější stěně tepny. Část autorů prováděla měření na bližší i vzdálenější stěně tepny a uváděný výsledek byl průměrem těchto dvou hodnot, zatímco jiní autoři prováděli měření tloušťky intimy medie pouze na vzdálenější stěně karotické tepny (Pignoli P., et al., 1986; Persson J., et al. 1994; Wendelhag I., et al., 1991; Raitakari OT., 1999).

Experimentální studie IMT

Ultrazvukový obraz normální karotidy můžeme rozdělit na 7 echo zón (Obr 4). Horní ohraničení každého echa, tzv. „leading edge“ (vedoucí echo) je skutečnou hranicí dané anatomické struktury. Spodní ohraničení tzv. „far edge“ (vzdálené echo) je pak závislé na nastavení GAIN (zisk) a dalších parametrech přístroje, které můžeme měnit, nikoli na skutečné tloušťce anatomické struktury. Všeobecným základním principem při ultrasonografickém vyšetřování je provádět veškerá měření pouze mezi vedoucími echy anatomických struktur. Z obrázku je zřejmé, že při měření tloušťky vrstvy intima-media, nelze použít sondě bližší stěnu cévy, kde měřením vzdálenosti mezi vedoucími echy získáme tloušťku celé bližší stěny karotidy.

Obr 4. Ultrazvukový obraz bifurkace arteria carotis communis, 7 ECHO zón



V roce 1990 provedl Wendelhag s kolegy in vitro několik experimentů, kterými definitivně prokázal, že skutečně objektivní ultrazvukové měření tloušťky intimy medie je možné pouze na vzdálenější stěně tepny (Wendelhag I., et al., 1991). Měření prováděl na lidských tepnách vyjmutých při pitvě, cílem experimentu bylo prokázat anatomický korelát vedoucího echa zóny 3 a 5.

Vypreparovaná arteria carotis byla umístěna do perfuzního roztoku a následně do ní byl z jedné strany pouštěn roztok s bublinkami vzduchu. Pomocí ultrazvuku bylo možno sledovat hyperechogenní vzduchové bublinky tvořící pomalu se pohybující vrstvičku mezi intimou bližší stěny tepny a perfuzním roztokem. Z experimentu bylo patrné, že vedoucí echo rozhraní intima-vzduchové bublinky přesně odpovídá vedoucímu echu zóny 3. Při postupu vrstvy bublinek podél bližší stěny tepny, byla echo zóna 3 postupně zcela překryta echem vznikajícím na rozhraní intima-vzduch. Byl tak podán důkaz, že vedoucí echo zóny 3 nevzniká na rozhraní media-intima bližší stěny tepny, ale na rozhraní intima-krev (perfuzní roztok) a vzdálené echo zóny 3 je topograficky na UZ obraze umístěno někde do lumen vyšetřované tepny, tedy mimo její vlastní stěnu.

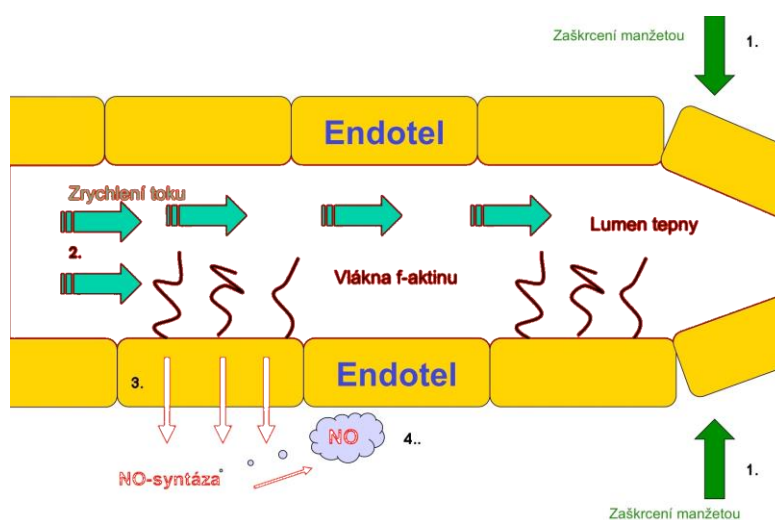
Bylo tedy prokázáno, že echo zóna 3 je tvořena rozhraním mezi stěnou tepny a krví, ne vlastní intimou a nelze tedy objektivně měřit vrstvu intima media na bližší stěně tepen. Dalším důvodem pro nevhodnost měření IMT na bližší stěně tepny je skutečnost, že ani vedoucí echo rozhraní adventicia-media bližší stěny nelze přesně zobrazit, což je pravděpodobně způsobeno tím, že vzdálené echo rozhraní periadventicia-adventicia interferuje s vedoucím echem rozhraní adventicia-media.

Na základě těchto studií je již metoda měření tloušťky komplexu intima-media především karotických tepen všeobecně přijímána za průkaznou.

Experimentální studie flow mediated dilatation FMD

Tato metoda je založena na měření na endotelu závislé dilatace periferních artérií (nejčastěji brachiální, vzácněji popliteální či femorální) ke které dochází v reakci na arteficiálně způsobenou hyperémií. V důsledku nafouknutí manžety tonometru na končetině distálně od místa měření, je způsobena ischemie v oblasti periferně od manžety a autoregulačními mechanismy dojde k vazodilataci rezistenčních cév periferně od místa okluze. Následné uvolnění okluze vyvolá na krátkou dobu urychlení toku krve (reaktivní hyperemii) ve sledované tepně nad místem okluze v důsledku nízké periferní rezistence dilatovaných rezistenčních cév. V tepně proximálně od místa okluze se v důsledku zrychlení toku krve zvyšuje smykové napětí (shear stress= třecí síla krevního proudu působící na povrch endotelové buňky), což způsobí aktivaci enzymu syntázy oxidu dusnatého (NO- syntázy) a vazodilataci cévy v důsledku uvolnění oxidu dusnatého (NO) (Corretti MC., et al., 2002) (Obr 5,6).

Obr 5. Princip metody flow mediated dilatation



1. zaškrcení periferie manžetou tonometru 2. po uvolnění okluze hyperemie, urychlení toku krve 3. zvýšení smykového napětí, aktivace NO-syntázy 4. uvolnění NO, vazodilatace. (NO- oxid dusnatý).

Tyto předpoklady se opírají o několik experimentálních prací.

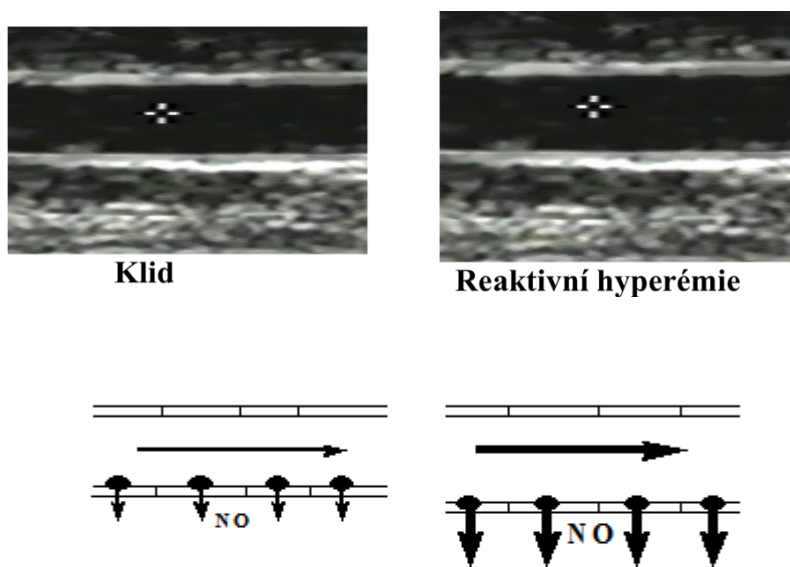
Koller publikoval studii, která ukázala, že urychlení průtoku v arteriolách kosterního svalstva potkana (při okluzi paralelních arteriol) způsobilo signifikantní vzestup smykového

napětí, který byl s určitou latencí následován vazodilatací, jež vedla následně k opětovnému snížení smykového napětí. Po arteficielním poškození endotelu arteriol pak ani při zvýšeném smykovém napětí k vazodilataci nedošlo (Koller A., Kaley G., 1991).

Joannides provedl experiment na 16 zdravých dobrovolnících (věk 24 ± 1 let) při kterém sledoval FMD za běžných podmínek a následně po podání inhibitoru NO syntázy N-monomethyl-L-argininu. Po jeho podání byla zkrácena doba hyperemické odpovědi (urychlení toku) a k dilataci tepny nedošlo, naopak se obrátila ve vazokonstrikci (Joannides R., et al. 1995). Tato studie podporuje předpoklad, že NO je esenciální při vazodilataci v důsledku hyperemie a že vyšetření FMD může být přínosné v neinvazivním stanovování kapacity lidských endoteliálních buněk k uvolňování NO jako odpověď na fyziologický podnět- hyperemii, stejně jako ke stanovování endotelové dysfunkce v případě její přítomnosti.

Následovaly další studie zaměřené na správnou metodiku vyšetření, Leeson sledoval míru FMD v závislosti na délce okluze. Zjistil, že s prodlužováním času okluze do 4.5 minut stoupá dilatace tepny a trvání maximálního průtoku, avšak delší okluze už k signifikantnímu zvýšení FMD nevedla (Leeson P., et al., 1997). V r. 2002 pak byla mezinárodní skupinou expertů správná metodika vyšetření FMD shrnuta v jednotné doporučení (Coretti MC., et al. 2002).

Obr 6. UZ obraz arteria brachialis v klidu a při vyšetření FMD.



Vyšetřování preklinické aterosklerózy u dětí s chronickým onemocněním ledvin

V oblasti pediatrie vzbudily možnosti vyšetření aterosklerózy již v preklinickém asymptomatickém stadiu velký zájem. Důvodem je skupina dětí s různými základními onemocněními s vysokým rizikem rozvoje časně aterosklerózy. Včasná diagnostika a případná léčba by mohly významně ovlivnit kardiovaskulární morbiditu a mortalitu právě těchto pacientů. Ultrazvukové metody jsou pro diagnostiku v dětském věku ideální už jen pro svou neinvazivitu, zároveň je však jejich použití v pediatrii omezeno určitými specifiky. Vzhledem k nízkému počtu takto závažně nemocných dětí v populaci, je například velmi obtížné vytvořit homogenní soubor pacientů o statisticky významném počtu účastníků. Z tohoto a dalších důvodů je zatím publikovaných studií zabývajících se vyšetřováním preklinické aterosklerózy u dětí relativně málo.

Několik autorů se zabývalo vyšetřováním přítomnosti preklinické aterosklerózy v běžné dětské populaci (Sass C., et al., 1998; Yang XZ., et al., 2007; Vercoza AM., et al., 2009; Tamura H., et al., 2011).

Významnou je práce polských a německých autorů, kteří vyšetřili tloušťku IMT karotických a femorálních tepen u 247 zdravých osob ve věku 10-20 let. Na základě jejich práce je možno si udělat představu o normálních hodnotách tloušťky IMT u mladých zdravých jedinců (Jourdan C., et al., 2005). Významná je také práce Johnsonové a spoluautorů, jež v rámci Bogalusa heart study vyšetřili CIMT u 336 zdravých mladých dospělých ve věku 25-37 let. Vyšetření bylo opakováno po 5.8 ± 0.6 letech. Tato práce ukázala, že u zdravých jedinců je průměrné rozšíření intimy-medie 0.01-0.02 mm za rok (Johnson HM., et al., 2007).

Studií posuzujících IMT u dětí v různé fázi chronické renální insuficience bylo publikováno několik. Všechny prokázaly signifikantně vyšší IMT ve skupině nefrologických pacientů oproti skupině zdravých vrstevníků (Mitsnefes MM., et al., 2004; Litwin M., et al., 2005; Civilibal M., et al., 2007; Poyrazoglu HM., et al., 2007; Bilginer Y., et al., 2007; Delucchi A., et al., 2008; Civilibal M., et al., 2009; Basiratnia M., et al., 2010) (Tab 4).

Tab 4. Výsledky publikovaných studií měření IMT u dětí s chronickým onemocněním ledvin a RRT.

Autor	rok	Kontrolní skupina (počet)	Výsledky kontrolní (mm)	Nemocní (počet)	Výsledky nemocní (mm)	p
Mitsnefes M	2004	33	0.38 ± 0.06	31 po tx: Živý dárce Kadav. dárce	0.41 ± 0.07 0.43 ± 0.08	0.03
Litwin M	2005	270	0.39 ± 0.04	CHRI 55 Dialyzovaní 37 Po tx 34	0.44 ± 0.06 0.48 ± 0.05 0.43 ± 0.05	0.001
Civilibal M	2007	15	0.41 ± 0.03	Dialyzovaní 39	0.51 ± 0.08	0.001
Poyrazoazlu HM	2007	20	0.51 ± 0.03	Dialyzovaní 34	0.56 ± 0.07	0.001
Biliginer Y	2007	20	0.28	Po tx 24	0.36	0.001
Delucchi A	2008	30	0.38 ± 0.009	Dialyzovaní 8 Po tx 12	0.45 ± 0.042 0.467 ± 0.033	<0.03
Civilibal M	2009	17	0.40 ± 0.04	CHRI 38 PD 23 HD 15	0.51 ± 0.08 0.51 ± 0.08 0.51 ± 0.09	<0.001 PD vs HD NS
Basiratnia M	2010	66	0.35 ± 0.03	Po tx 66	0.43 ± 0.05	0.001

(tx – transplantace ledviny, CHRI- chronická renální insuficience, RRT- renal replacement therapy- léčba nahrazující funkce ledvin, PD peritoneální dialýza, HD hemodialýza)

Dosud byl prezentován jen malý počet studií zabývajících se vyšetřováním endotelové dysfunkce u dětí. První práce byla publikována v roce 1992 Celermajerem, který prokázal u dětí a mladých pacientů s familiární hypercholesterolemií (FH) významné snížení FMD (Celermajer DS., et al., 1992). V r. 2002 Jarvisalo vyšetřil FMD u 105 zdravých dětí ve věku 9-11let (Jarvisalo MJ, et al., 2002). Zjistil, že maximální dilatace brachiální artérie bylo dosaženo za 79 ± 33 sekund po uvolnění okluze. Je tedy potřeba FMD měřit déle než první minutu po uvolnění okluze, jak bylo použito v některých předešlých studiích. Stejný autor následně měřil FMD i CIMT u 147 dětí ve věku 8-17 let včetně 41 dětí s diabetem a 14 dětí s FH. FMD negativně korelovala jak s věkem, body mass indexem, diabetem a hladinou sérového LDL, tak s tloušťkou intimy-medie (Jarvisalo, MJ., et al., 2004).

V roce 2003 publikovali holandští autoři výsledky studie, v rámci které měřili FMD u 20 dětí po úspěšné transplantaci ledviny ve věku 7-18 let. Ve skupině nefrologických dětí našli významné snížení FMD ($7,7 \pm 5.4\%$) oproti kontrolní skupině ($15 \pm 7\%$) (Lilien MR., et al., 2003).

Oproti tomu novější studie Wilsonové a spolupracovníků u pacientů s mírnějším stupněm chronického renálního selhání (CHRI stadia 2-4, glomerulární filtrace (GFR) $15-89 \text{ ml/min/1,73m}^2$) je méně optimistická ve věci využití metody FMD jako ukazatele časných změn cévního systému, s mediánem FMD obdobným ve skupině pacientů i zdravých kontrol (FMD 6.3% vs 6.7% $P=0.85$). Přesto však u deseti dětí (23%) s CHRI bylo FMD abnormálně nízké ($<1.1\%$) (Wilson AC., et al., 2008).

Klinické studie

- I Menopauzální přechod zvyšuje aterogenní riziko kouření u žen středního věku (zavedení metodiky CIMT, studie variability, standardizace metody)**

- II Preklinické známky aterosklerózy u dětí s chronickým onemocněním ledvin**

- III Snížení proteinurie během intenzivní antihypertenzní léčby u dětí po transplantaci ledviny**

I. Menopauzální přechod zvyšuje aterogenní riziko kouření u žen středního věku (zavedení metodiky CIMT, studie variability, standardizace metody)

Hypotéza

Menopauzální přechod má vliv na tradiční i nově diskutované rizikové faktory aterosklerózy

Cíle

1. Standardizovat metodiku ultrazvukového vyšetření tepen metodou CIMT a jejího off-line hodnocení, studie variability
2. Stanovit význam různých rizikových faktorů pro aterosklerotické postižení tepen u žen středního věku a jejich eventuelních změn v období premenopauzy, menopauzálního přechodu a postmenopauzy.

Metodika

Vyšetřovaná skupina

Účastnicemi naší studie byly ženy populační studie The Prague Pre and Post Menopausal Females study (3PMFs). Studijní skupina 3PMFs je tvořena reprezentativním 5% vzorkem 29 440 žen ve věku 45-54 let žijících v Praze. Byly vybrány náhodně z registru zdravotních pojišťoven.

Z náhodně vybraného 5% vzorku 1472 žen jich 699 splnilo veškerá kritéria pro zařazení do studie a bylo ochotno se studii účastnit. Navíc, pro stanovení potenciálního vlivu menopauzálního přechodu a kouření na výkyvy ženských pohlavních hormonů, bylo 40 žen vyšetřeno v rámci Hormone Variability study (HVs). Ženy ze skupiny HVs byly pozvány ke třem vyšetřením ve 4 týdenních intervalech, během první návštěvy vyplnily protocol 3PMFs a navíc k vyšetřením 3PMFs study u nich byl vyšetřen reverzní transport cholesterolu (cholesterol efflux) a počet cirkulujících endotelových progenitorových buněk. Kromě toho u nich byly ve čtyřtýdenních intervalech stanovovány hladiny pohlavních hormonů (estradiol, celkový a volný testosteron a anti-Mulleriánský hormon). Důvodem hormonálního vyšetření byla snaha o stanovení hormonální variability v souvislosti s reprodukčním stavem a kouřením.

Předpokládali jsme, že menopauzální přechod a kouření mohou značně zvýšit kolísání v koncentraci hormonů. Do skupiny HVs byly zařazeny pouze ženy bez závažného kardiovaskulárního onemocnění včetně hypertenze a diabetes mellitus, bez léčby antihypertenzivy či hypolipidemiky, bez jakékoli hormonální léčby.

Studie byla schválena místní Etickou komisí IKEM (Institut klinické a experimentální medicíny) Praha, všichni účastníci podepsali informovaný souhlas.

Navíc autoři studie potvrdili splnění Principles of Ethical Publishing in the International Journal of Cardiology (Shewan LG., Coats AJ., 2010).

Antropometrické a klinické vyšetření

Byla získána anamnestická data všech účastnic zaměřená na přítomnost kardiovaskulárních onemocnění a jejich hlavních rizikových faktorů včetně údajů o eventuelní hysterektomii a/nebo ovairektomii. Obě vyšetřované skupiny- ženy z populačního vzorku i ženy z detailnější metabolické studie, byly vyšetřeny dle stejného protokolu. Výška, váha, obvod pasu a krevní tlak byly stanoveny v souladu s protokolem WHO MONICA (Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease) (Thunstall-Pedoe H., 1985). Body mass

index byl vypočítán dle vzorce $\text{hmotnost} \text{ v kilogramech} / \text{lomeno} \text{ druhá mocnina výšky v metrech}$. Ženy s anamnézou současného či dřívějšího pravidelného kouření byly definovány jako kuřačky. Nepravidelné kuřačky (méně než 1 cigareta denně) byly z analýzy vyloučeny. Systolický a diastolický krevní tlak jsme měřili u sedící vyšetřované na pravé paži po minimálně 10 minutách klidu. Žilní krev byla odebrána po nočním lačnění. Celkový cholesterol a triacylglyceroly byly měřeny plně automatickou (HITACHI 911 Auto Analyzer, Japan) enzymatickou metodou. Koncentrace HDL a LDL cholesterolu byly stanoveny stejnou metodou po precipitaci sérových lipoproteinů. Folikuly stimulující hormon (FSH) byl měřen za použití kitů IRMA (Immunotech, Praha, Česká republika).

Definice kategorických/nespojitéch rizikových faktorů

Hypertenzi jsme definovali jako systolický krevní tlak roven a nebo vyšší než 140 mmHg a diastolický krevní tlak roven a nebo vyšší než 90 mmHg, či užívání antihypertenzních léčiv. Dyslipidemie byla definována jako hladina celkového cholesterolu vyšší než 5.0 mmol/l, sérových triacylglycerolů vyšší než 1.7 mmol/l, sérového HDL cholesterolu nižší než 1.2 mmol/l, nebo užívání hypolipidemik. Intolerance glukózy a/nebo diabetes mellitus byla definována jako glykémie na lačno rovna a nebo vyšší než 5.6 mmol/l nebo užívání antidiabetik včetně inzulínu. Nadváha byla definována jako BMI roven či vyšší než $25 \text{ kg}\cdot\text{m}^2$. Centrální obezita byla definována jako obvod pasu roven nebo větší než 88cm.

Definice reprodukčního stavu

Všechny ženy označily svou poslední menstruační periodu (PMP). Ke stanovení reprodukčního stavu jsme použili definice navržené "Stages of Reproductive Aging Workshop" (STRAW) (Soules MR., et al., 2001) v kombinaci s hladinou plazmatického FSH. Na základě těchto informací byly ženy rozděleny do 3 skupin: premenopauzální- pokud PMP byla do 61 dní před zahájením studie (STRAW stadium -5 až -2) a FSH stejně či nižší než 40 IU/l; perimenopauzální, pokud byla PMP 61-365 dní před zahájením studie (stadia -1 až +1a) a FSH vyšší než 40 IU/l a postmenopauzální pokud PMP byla déle než 365 před zahájením studie (stadia +1b až +2) a FSH byl vyšší než 40 IU/l.

Měření subklinické aterosklerózy

IMT společné karotidy jsme měřili za požití ultrasonografického přístroje Acuson 128/4 (Mountain View, CA, USA) se 7 MHz sondou u všech vyšetřovaných v horizontální poloze. Z laterálního přístupu byly identifikovány longitudinální obrazy pravé a levé společné

karotidy a uloženy na magnetickou pásku SVHS (Super home video system). Následná měření byla prováděna v počítačovém programu Image Measure PC Vision Micro Science (Imaging Technology Inc., Bedford, MA, USA). Pro následné měření jsme modifikovali dříve popsanou metodiku opakovaného bodového měření CIMT na 5 místech daného 10 mm úseku proximálně od karotického bulbu (Pitha J., et al., 1999) dle recentních doporučení (Stuchlíková H., et al., 2005).

Na digitalizovaných obrazech pak byly v 10 mm dlouhém úseku tepny mechanicky označeny rozhraní medie-adventicie a intima-lumen, mezi kterými následně počítačový program provedl vlastní měření.

Pro statistickou analýzu pak byl použit medián hodnot 4 vyšetření vzdálenější stěny deseti milimetrového úseku obou společných karotid (dvě pro pravou společnou karotidu a dvě pro levou společnou karotidu). Všechna UZ měření byla provedena jediným vyšetřujícím. Veškerá následná off-line měření byla provedena školeným technikem, zaslepeným vůči ostatním výsledkům účastníků studie. Variabilitu měření jsme stanovili opakovaným vyšetřením náhodně zvolených 10 žen. Koeficient variability byl 4,9%.

Měření reverzního transportu cholesterolu (efflux cholesterolu) a počtu endotelových progenitorových buněk

Měření byla provedena dříve použitými a popsanými metodami (Kralova Lesna I., et al., 2008; Fadini GP et al., 2008).

Pohlavní hormony

Ve skupině HVs byly k hodnotám FSH stanovovány další hormony a to třikrát ve 4 týdenních intervalech: estradiol, celkový a volný testosteron a anti-Mulleriánský hormon. Estradiol byl měřen metodou ELISA (Beckman Coulter), anti-Mulleriánský hormon enzymovou immunoassay AMH/MIS (A16507, Beckman Coulter Company) a celkový a volný testosteron imunoprecipitační metodou (InterMedical, Italy).

Statistická analýza

Hodnoty jsou uvedeny jako procenta pro kategorické veličiny a průměry pro spojité veličiny. Pro statistické srovnání rozdílů spojitých veličin mezi jednotlivými skupinami byl použit t-test (Student) nebo analýza rozptylu (ANOVA) či analýza kovariance (ANCOVA). V případě kategorických veličin byl použit χ^2 (chí kvadrát) test. K detekci proměnných signifikantně asociovaných se subklinickou aterosklerózou jsme použili metodu parciální

korelace (standardizace na věk). Jako proměnné byly a priori stanoveny: věk, anamnéza hysterektomie/ovariektomie, náhradní hormonální léčba, antihypertenzní/hypolipidemická léčba, kouření, BMI, obvod pasu, systolický a diastolický krevní tlak, celkový cholesterol, triacylglyceridy, LDL a HDL cholesterol.

Souvislost mezi rizikovými faktory a CIMT byla hodnocena pomocí mnohotné postupné lineární regrese. Vztah mezi reprodukčním stavem a rizikovými faktory v predikci CIMT byl hodnocen opět testem kovariance (ANCOVA). Ve skupině HVs bylo porovnání průměrů provedeno použitím t-testu (Mann-Whitney) při standardizaci na věk a body mass index, pokud bylo vhodné. Porovnání variability v hladinách hormonů bylo provedeno za použití standardní odchylky průměrů tří následujících měření a rozdíly stanoveny t-testem. Uváděné hodnoty koncentrací pohlavních hormonů (estradiol, anti-Mulleriánský hormon, celkový a volný testosteron) jsou průměrnou hodnotou tří následných měření ve 4 týdenních intervalech.

Výsledky

Skupina 3PMFs

Klinické charakteristiky žen rozdělených dle reprodukčního stavu jsou zobrazeny v tabulce 5. Postmenopauzální ženy byly nejstarší a vykazovaly nejvyšší prevalenci/hodnoty téměř všech vyšetřovaných kardiovaskulárních rizikových faktorů. Jedinou výjimkou byla prevalence současného kouření, jež byla nejvyšší u skupiny perimenopauzálních žen. Na druhou stranu počet cigaret vykouřených během 24 hod byl obdobný ve všech skupinách kuřáček (11.8 ± 7.8 u premenopauzálních, 10.7 ± 7.7 u žen v menopauzálním přechodu a 12.9 ± 7.6 u menopauzálních žen). Perimenopauzální ženy měly příznivější hodnoty plazmatických triacylglycerolů a HDL cholesterolu než ostatní dvě skupiny.

Perimenopauzální a postmenopauzální ženy byly častěji léčeny hypolipidemiky a antihypertenzivy. Průměrná CIMT byla lehce vyšší u postmenopauzálních žen ve srovnání s premenopauzálními. Nenalezli jsme statisticky významný rozdíl v tělesné hmotnosti, hodnotách krevního tlaku a anamnéze dřívějšího kouření v porovnávaných skupinách.

Tab 5. Charakteristiky žen zařazených do studie rozdělených dle reprodukčního stavu. (Hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta nebo průměry s intervaly spolehlivosti 95%)

	Premenopauza (n=397)	Perimenopauza (n=61)	Postmenopauza (n=241)	P (Globální test rovnosti)
Věk (roky)	48.7 (48.4, 49.0)	51.1 (50.5, 51.7)	52.0 (51.7, 52.3)	p<0.0001
Hysterektomie a bilaterální ovariektomie	-	8.2% (1.3%, 15.1%)	13.8% (9.4%, 18.2%)	p<0.0001
Hormonální léčba	15.9% (12.3%, 19.5%)	23.0% (12.4%, 33.6%)	30.4% (24.6%, 36.2%)	p<0.0001
Současné kuřačky	29.5% (25.0%, 34.0%)	42.6% (30.2%, 55.0%)	39.6% (33.4%, 45.8%)	p=0.0113
Bývalé kuřačky	16.1% (12.5%, 19.7%)	13.1% (4.6%, 21.6%)	15.4% (10.8%, 20.0%)	p=0.8296
Hypolipidemická nebo antihypertenzní léčba	16.9% (13.2%, 20.6%)	24.6% (13.8%, 35.4%)	27.0% (21.4%, 32.6%)	p=0.0078
Body mass index (kg/m ²)	25.7 (25.2, 26.2)	25.0 (23.3, 26.7)	26.2 (25.5, 26.9)	p=0.1524
Obvod pasu (cm)	85.4 (84.1, 86.7)	85.9 (81.6, 90.2)	88.3 (86.5, 90.1)	p=0.0110
Systolický krevní tlak (mmHg)	119.1 (117.4, 120.8)	119.9 (115.0, 124.8)	120.2 (117.7, 122.5)	p=0.6902
Diastolický krevní tlak (mmHg)	79.1 (78.179.6)	79.7 (76.5, 82.9)	79.3 (77.9, 80.7)	p=0.8696
Plazmatické triacylglyceroly (mmol/l)	1.27 (1.19, 1.35)	1.21 (1.03, 1.37)	1.45 (1.32, 1.58)	p=0.0093
HDL cholesterol (mmol/L)	1.62 (1.58, 1.66)	1.76 (1.64, 1.88)	1.65 (1.59, 1.71)	p=0.0253
LDL cholesterol (mmol/L)	3.27 (3.18, 3.36)	3.32 (3.08, 3.56)	3.69 (3.56, 3.82)	p<0.0001
Lačná glykémie (mmol/l)	5.16 (5.07-5.25)	5.41 (5.12-5.70)	5.26 (5.15-5.37)	0.0889
Intima media thickness společné karotidy (mm)	0.569 (0.562, 0.576)	0.574 (0.556, 0.592)	0.599 (0.588, 0.610)	p<0.0001

Použili jsme metodu mnohotné postupné lineární regrese k identifikaci kardiovaskulárních rizikových faktorů nezávisle asociovaných s CIMT. Ve všech skupinách žen jsme našli nezávislou asociaci CIMT s věkem, BMI, kouřením, systolickým krevním tlakem a HDL cholesterolem. Vzhledem k tomu, že ve skupinách bývalých a aktivních kuřáček se výsledky téměř nelišily, byly tyto skupiny spojeny.

Abychom zjistili, zda je souvislost kardiovaskulárních rizikových faktorů a CIMT modifikována reprodukčním stavem, rozdělili jsme ženy podle reprodukčního stavu a studovaných rizikových faktorů (kouření, diabetes mellitus, nadváha, hypertenze, dyslipidemie). Z hlediska jejich asociace s CIMT, jsme následně testovali vztahy mezi jednotlivými rizikovými faktory a reprodukčním stavem.

Vzestup hodnot CIMT s věkem byl ve skupině perimenopauzálních žen zřetelně strmější u aktivních/bývalých kuřáček, než u žen, které nikdy nekouřily ($p=0.005$), zatímco u premenopauzálních a postmenopauzálních žen jsme tento rozdíl nepozorovali. Při použití mnohočetné lineární regrese byl rozdíl ve změnách CIMT za rok kalendářního věku mezi kuřáčkami a nekuřáčkami signifikantně vyšší ve skupině perimenopauzálních žen, než u žen v ostatních dvou skupinách (Tab 6).

Modifikace účinku kouření na CIMT reprodukčním věkem byla následně analyzována znovu se standardizací na věk, BMI, systolický krevní tlak a HDL cholesterol (Tab 7). Byl nalezen signifikantní vztah mezi reprodukčním věkem a kouřením ($p=0.035$).

Tab 6. Změny tloušťky CIMT (mm) v závislosti na věku (roky) dle kouření a reprodukčního stavu, standardizováno při modelování na věk, body mass index, systolický krevní tlak a HDL cholesterol. Koeficient mnohočetné lineární regrese (95% CI).

	Premenopauza	Perimenopauza	Postmenopauza
Kuřáčky	n=179	n=34	n=132
	0.0035 (-0.002; 0.0073)	0.0164 (0.0092; 0.0236)	0.002 (-0.0052; 0.0092)
Nekuřáčky	n=214	n=27	n=107
	0.0053 (0.0019; 0.0088)	-0.0099 (-0.0301; 0.0102)	0.0013 (-0.0055; 0.0080)

Tab 7. Vliv kardiovaskulárních rizikových faktorů na tloušťku intima-media karotických tepen včetně vztahu mezi kouřením a reprodukčním stavem (výsledky analýzy ANCOVA)

Kovariance	Koeficienty regrese	p
Věk	3.801	0.0011
Body mass index	2.19	0.0003
Systolický krevní tlak	0.71	<0.0001
HDL cholesterol	-16.257	0.0183
Efekty	F-statistika (df1, df2)	p
Kouření	9.05 (1, 683)	0.0026
Reprodukční věk	3.69 (2, 683)	0.0255
Vzájemný vztah: Reprodukční stárnutí a Kuřáctví	3.36 (1, 683)	0.0352

Nenalezli jsme statisticky významný rozdíl mezi všemi ostatními sledovanými rizikovými faktory z hlediska reprodukčního stavu. Tyto nálezy se významněji nezměnily ani po zahrnutí dalších faktorů do statistických modelů (léčba hypolipidemiky a antihypertenzivy; hormonální léčba, hysterektomie či bilaterální ovariektomie).

Skupina HVs

Srovnání kardiovaskulárních rizikových a protektivních faktorů a pohlavních hormonů mezi vyšetřovanými skupinami ukazuje Tabulka 8.

Ve skupině žen v menopauzálním přechodu, byly nekuřačky starší ($p=0.04$), měly vyšší HDL cholesterol ($p=0.006$), Apolipoprotein A1 ($p=0.018$), efflux cholesterolu ($p=0.048$), vyšší počet cirkulujících kmenových buněk ($p=0.047$) a endoteliálních progenitorových buněk ($p=0.010$), nižší triacylglyceroly ($p=0.018$) a nižší tepovou frekvenci ($p=0.040$) než ženy kuřačky. Po standardizaci na věk a BMI měly nekuřačky vyšší počet cirkulujících endotelových progenitorových buněk ($p=0.023$), nižší triacylglyceroly ($p=0.021$), vyšší HDL cholesterol ($p=0.011$) a hodnoty efluxu cholesterolu hraniční významnosti ($p=0.065$).

	Menopauzální přechod	Menopauza
--	----------------------	-----------

U menopauzálních žen nekuřaček byly hodnoty glykémie a volného testosteronu signifikantně vyšší než u žen kouřících ($p=0.034$). Po standardizaci na věk a BMI již tyto rozdíly nebyly dále signifikantní.

Nenalezli jsme žádné další statisticky významné rozdíly mezi vyšetřovanými skupinami z hlediska reprodukčního stavu a kouření.

Při analýze kolísání hladin pohlavních hormonů, vyjádřených jako směrodatné odchytky (standard deviations) tří následných měření, jsme prokázali signifikantní rozdíly v kolísání hladin volného testosteronu mezi skupinami kuřaček a nekuřaček. Tyto rozdíly byly zcela protichůdné u žen v menopauzálním přechodu ve srovnání s postmenopauzálními ženami.

Ve skupině žen v menopauzálním přechodu měly kuřačky vyšší variabilitu volného testosteronu než nekuřačky (0.09 ± 0.14 vs. 0.24 ± 0.17 , $p=0.051$). Naopak ve skupině žen po menopauze měly kouřící ženy signifikantně nižší variabilitu hodnot volného testosteronu než nekuřačky (0.24 ± 0.09 vs. 0.43 ± 0.49 , $p=0.026$). Nepozorovali jsme žádné další statisticky významné rozdíly ve vlivu reprodukčního stavu a kouření na kolísání hladin estradiolu, anti-Mulleriánského hormonu a celkového testosteronu mezi studovanými skupinami.

Tab 8. Charakteristiky žen podstudie HVs, rozděleny dle reprodukčního stavu a kouření. (Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry s intervaly spolehlivosti 95%).

	Menopauzální přechod		Menopauza	
	Nekuřačky n=13	Kuřačky n=10	Nekuřačky n=9	Kuřačky n= 8
Věk (roky)	50.6 (48.6, 52.6)	47.0 (44.8, 49.2) *	53.8 (53.0, 54.6)	54.3 (53.4, 55.2)
Počet cigaret na den	-	11.8 (6.4, 17.2)	-	10.9 (6.9,14.9)
Body mass index (kg/m^2)	26.0 (23.1, 28.9)	26.1 (22.9, 29.3)	26.4 (24.4, 28.4)	22.8 (20.4, 25.2) *
Systolický krevní tlak (mm Hg)	114.3 (107.1, 121.5)	116.9 (111.4, 122.4)	117.5 (112.5, 122.5)	116 (108.4, 123.6)

	Nekouřáčky n=13	Kouřáčky n=10	Nekouřáčky n=9	Kouřáčky n= 8
Diastolický krevní tlak (mm Hg)	70.3 (66.2, 74.4)	72.8 (69.0, 76.6)	70.3 (66.9,73.7)	72.1 (68.3, 75.9)
Tepová frekvence (tepy/minutu) adjustováno	62.6 (58.7, 66.5) 62.9 (58.8, 67)	68.5 (64.0, 73.0) * 68.0 (63.1, 72.9)	65.6 (59.0, 72.2)	65.9 (58.5, 73.3)
Triglyceridy (mmol/L) adjustováno	0.97 (0.81, 1.13) 0.98 (0.67, 1.29)	1.60 (1.09, 2.11)* 1.63 (1.28, 1.98)*	1.21 (0.82, 1.60)	2.22 (-0.11, 4.55)
LDL cholesterol (mmol/L)	3.04 (2.67, 3.41)	3.01 (1.36, 4.66)	3.57 (2.96, 4.18)	3.30 (2.65, 3.95)
HDL cholesterol (mmol/L) adjustováno	2.00 (1.82, 2.18) 1.98 (1.78, 2.18)	1.50 (1.26, 1.74)** 1.53 (1.29, 1.77)*	1.97 (1.72, 2.22)	1.65 (1.45, 1.85)
Apolipoprotein A1 (g/L) adjustováno	1.76 (1.60, 1.92) 1.74 (1.58, 1.90)	1.50 (1.34, 1.66)* 1.52 (1.32, 1.72)	1.67 (1.53, 1.81)	1.72 (1.50, 1.94)
Efflux cholesterolu (%) adjustováno	21.4 (20.4, 22.4) 21.4 (20.6, 22.2)	19.9 (19.1, 20.7)* 20.1 (19.1, 21.1)	20.7 (19.7, 21.7)	20.7 (19.1, 22.3)
Glykemie (mmol/l) adjustováno	5.4 (5.1, 5.7)	5.4 (5.2, 5.6)	6.0 (5.8, 6.2) 5.8 (5.4, 6.2)	5.3 (4.6, 6.0) * 5.5 (5.1, 5.9)
Cirkulující kmenové buňky (počet/ml) Adjustováno	2,044 (1,440,2,648) 1,925 (1,455, 2,395)	1,128 (946, 1,310)* 1,284 (739, 1,829)	1,263 (925, 1,601)	1,376 (692, 2,060)
Endoteliální progenitorové buňky (počet/ml) adjustováno	286 (189, 383) 289 (-191, 769)	116 (52, 180) ** 112 (10, 214) *	90 (63, 117)	78 (33, 123)
Anti-Mülleriánský hormon (pmol/L)	5.70 (3.56, 7.84)	12.30 (5.48, 19.12)	5.25 (4.64, 5.86)	4.49 (3.22, 5.76)
Estradiol (pmol/L)	455 (332, 578)	316 (200, 432)	98 (60, 136)	72 (57, 87)
Celkový testosteron (ng/ml)	0.37 (0.21, 0.53)	0.50 (0.36, 0.64)	0.41 (0.27, 0.55)	0.64 (0.39, 0.89)
Volný testosteron (pg/ml) adjustováno	0.52 (0.09, 0.95)	1.05 (0.62, 1.48)	1.23 (0.64, 1.82) 1.03 (0.54, 1.52)	0.56 (0.15, 0.97) * 0.78 (0.25, 1.31)

Diskuze

Modifikovanou metodou měření tloušťky intima media jsme vyšetřili všech 699 účastnic studie. Při opakovaném měření CIMT stejným vyšetřujícím u náhodně vybraných 10 žen jsme stanovili variabilitu vyšetření 4,9%. Tento výsledek je ve shodě s dříve prezentovanými pracemi jiných autorů (Salonen R., 1991; Belcaro G., 1993) a svědčí o vysoké výpovědní hodnotě metody.

Na základě našich zjištění je možno konstatovat, že reprodukční stav silně modifikuje vliv kouření na karotické tepny, cirkulující endotelové progenitorové buňky, reverzní transport cholesterolu a kolísání hladin volného testosteronu.

Rozdíly v rizikových faktorech mezi kouřícími ženami a nekuřačkami byly nalezeny téměř jednotně pouze u žen v menopauzálním přechodu.

Zjištění, že reprodukční stav a kouření se mohou vzájemně ovlivňovat takto komplexním způsobem je, pokud víme, nové, jelikož tato otázka nebyla v předešlých studiích systematicky sledována.

Význam tohoto zjištění je dále podporován recentně publikovanými výsledky ukazujícími, že kouření může být výrazněji škodlivé pro ženy než pro muže (Grundtvig M., et al., 2009; Huxley RR., 2011).

Naše data ukazují, že navíc k rozdílu pohlaví může být významným také reprodukční věk. Možné biologické vysvětlení zvýšené citlivosti k aterosklerotickým změnám perimenopauzálních žen bude velmi pravděpodobně komplexní, na základě našich výsledků bychom chtěli upozornit na tři potenciálně zajímavé poznatky.

1. Negativní vliv kouření na ochranu cévní stěny může být škodlivější v menopauzálním přechodu, než v menopauze samotné. Hypotéza “menopauzálního aterosklerotického přechodu” (Munir JA, et al., 2012; Wild RA., 2012) je dále podporována nálezem signifikantně vyššího počtu cirkulujících endoteliálních progenitorových buněk u nekuřaček, než u kouřících žen, ale výhradně v období menopauzálního přechodu a ne v menopauze. Tato zjištění, jež nejsou ovlivněna potenciálními rozdíly ve věku a BMI, by mohla být velice důležitá, jelikož téměř vždy je pozornost zaměřena spíše na faktory rizikové než ochranné (s výjimkou HDL cholesterolu).

Z tohoto pohledu byla nedávno prokázána souvislost mezi endotelovými progenitorovými buňkami a ischemickou chorobou srdeční, týkající se kolaterální koronární cirkulace; navíc tyto vztahy přetrvávaly nehledě na nepřítomnost podstatných rozdílů mezi tradičními rizikovými faktory (Tokgozoglul L., et al., 2011).

Celkově je možno shrnout, že u žen v menopauzálním přechodu a to včetně žen kouřících byl rizikový profil zahrnující metabolické faktory a krevní tlak velmi příznivý, s výjimkou ukazatelů reverzního transportu cholesterolu.

Konstantní a velmi působivý rozdíl mezi kouřícími ženami a nekuřačkami v počtu cirkulujících endotelových progenitorových buněk opravdu naznačuje možnou kritickou úlohu reparativních procesů v tomto životním období.

Reverzní transport cholesterolu může být kouřením narušen více u žen v menopauzálním přechodu, než u žen postmenopauzálních. V naší studii jsme našli hodnoty HDL cholesterolu a reverzního transportu cholesterolu značně nižší a triacylglyceroly podstatně vyšší u kuřáček v menopauzálním přechodu, ne však u postmenopauzálních žen. Výsledky nebyly podstatněji ovlivněny věkem ani BMI účastnic. Tato pozorování rovněž podporuje nález v celé populaci žen z hlediska významu reverzního transportu cholesterolu vyjádřeného současně hladinami HDL cholesterolu i triglyceridů.

3. Třetím zajímavým nálezem je větší variabilita hladin volného testosteronu u kouřících žen v menopauzálním přechodu narozdíl od žen menopauzálních, kde jsme našli větší fluktuaci hodnot u nekuřáček. Změny pohlavních hormonů v důsledku kouření již byly popsány v průřezových studiích včetně těch rozsáhlých (Brand JS., et al., 2011; Dafopoulos A., et al., 2010; Plante BJ, et al., 2010), ale pokud víme, žádná z těchto prací se nezabývala otázkou variability hodnot pohlavních hormonů.

Tato data tudíž podporují hypotézu, že rychlost a stupeň hormonálních změn by mohly být významnějším faktorem než absolutní velikost těchto změn a mohly by být výrazně modifikovány kouřením. Nicméně, tyto nálezy by měly být potvrzeny v rozsáhlejší prospektivní studii.

V řadě populačních studií jiných autorů byla téměř jednotně nalézána silná asociace mezi věkem, systolickým krevním tlakem a body mass indexem a subklinickou aterosklerózou u žen nezávisle na reprodukčním stavu. Z plazmatických lipidů se nezávislým prediktorem subklinické aterosklerózy v populačních studiích jeví pouze HDL cholesterol, což potvrzuje již výše diskutovaný význam reverzního transportu cholesterolu. Vliv reprodukčního věku na složení a funkci HDL částic byl již dříve popsán (Fan AZ., Dwyer JH, 2007). V naší studii jsme našli vliv reprodukčního stavu a kouření nejen na HDL cholesterol, ale také na reverzní transport cholesterolu vyjádřený nezávisle jako efflux cholesterolu.

Určitou limitací je průřezový charakter naší studie. Otázka, zda menopauzální přechod skutečně představuje zranitelnější období pro progresi aterosklerózy u žen s anamnézou nikotinu je potřeba definitivně potvrdit v dalších prospektivních studiích.

Dalším omezením je v naší práci relativně malý počet žen v menopauzálním přechodu. Přesto, že jsme našli silnou vazbu mezi reprodukčním stárnutím a kouřením co se týče kardiovaskulárních rizik, stále nemůžeme vyloučit možnost, že reprodukční stárnutí může být zároveň modifikováno vlivem dalších rizikových faktorů, které se nám nepodařily detekovat ani v jedné zkoumané populaci.

Oproti tomu pozitivní přínos spatřujeme v populačním založení naší studie s dobře definovaným a zavedeným výstupem (subklinická ateroskleróza karotických tepen detekovaná pomocí ultrazvuku) a provedení studie v jednom centru. Dalším přínosem je užití pevně uznávaných kritérií definice reprodukčního stavu. Navíc hypotéza shledávající menopauzální přechod velmi citlivým obdobím zejména u kuřáček byla podpořena výsledky menší studie u podskupiny žen u kterých bylo provedeno detailnější vyšetření hormonálního stavu včetně variability hormonálních hodnot během 3 měsíců, reverzního transportu cholesterolu a počtu cirkulujících endotelových progenitorových buněk.

Závěr

V populační studii žen středního věku se tedy aterogenní vliv kouření zdá být silně modifikován reprodukčním stavem. Zjistili jsme, že v období menopauzálního přechodu, zejména za přítomnosti kouření, může být pro progresi aterosklerotického postižení karotických tepen významně citlivější periodou než období premenopauzy či menopauzy samotné. Tento vliv může být zprostředkován různými mechanismy včetně snížené ochrany cév, poruchou reverzního transportu cholesterolu a narušenou rovnováhou pohlavních hormonů.

II. Preklinické známky aterosklerózy u dětí s chronickým onemocněním ledvin

Hypotézy

1. Proces aterosklerózy začíná v dětském věku a je výrazně akcentován u dětí s chronickým renálním selháním. Tento proces však zřejmě není způsoben převážně poruchami lipidového metabolismu jako u běžné populace s normální funkcí ledvin, ale jinými mechanizmy specifickými pro pacienty s chronickým renálním selháním.
2. U dětských pacientů s chronickým renálním selháním mohou hrát při postižení tepen dominantní roli imunitní, zánětlivé, nutriční a další parametry detekovatelné stanovením biomarkerů v periferní krvi.

Cíle

1. Zjistit, zda lze u pacientů s chronickým renálním selháním sledovat známky preklinické aterosklerózy neinvazivními ultrazvukovými metodami již v dětském věku
2. Detekovat význam rizikových faktorů- klasických i nově diskutovaných pro známky preklinické aterosklerózy u dětí postižených renálním selháním, a jejich závislost na způsobu léčby nahrazující funkce ledvin (dialýza, transplantace)

Metodika

Skupiny

Naší studie se zúčastnilo 37 dětí zařazených v dialyzačně –transplantačním programu Pediatrické kliniky FN v Motole v konečné fázi renálního selhání s léčbou nahrazující funkce ledvin. Průměrný věk sledovaných pacientů byl $14,5 \pm 3,3$ let; 20 chlapců a 17 dívek. 31 dětí podstoupilo úspěšnou transplantaci ledviny (tx), šest bylo léčeno peritoneální dialýzou (PD). K selhání ledvin u našich pacientů vedly následující onemocnění: dědičné nefropatie (n=11), renální hypo- či dysplázie (n=6), glomerulonefritida (n=3), tubulointersticiální nefritida (n=3), obstrukční uropatie (n=2), refluxní nefropatie (n=2), hemolyticko-uremický syndrom (n=1) a neznámé příčiny (n=2). Průměrný čas mezi RRT a UZ vyšetřením byl $4,4 \pm 2,7$ let a průměrný čas mezi dialýzou a transplantací $12,5 \pm 11$ měsíců.

Všechny dialyzované děti byly léčeny kontinuální cyklickou peritoneální dialýzou.

Žádný ze sledovaných pacientů netrpěl onemocněním diabetes mellitus ani závažnou poruchou metabolismu lipidů. 34 dětí (92%) ve sledované skupině bylo léčeno pro arteriální hypertenzi. Ve skupině transplantovaných pacientů byli čtyři léčeni analogy vitamínu D, žádný pacient neužíval vazač fosfátů. Ve skupině PD pacientů byli všichni léčeni vazači fosfátů a čtyři navíc analogy vitamínu D.

Kontrolní skupinu tvořilo 22 zdravých dětí (věk $11,0 \pm 4,4$ let; 10 chlapců, 12 dívek), děti zaměstnanců kliniky a pacienti alergologické a gastroenterologické ambulance Pediatrické kliniky, bez poruchy metabolismu lipidů či léčby systémovými steroidy.

Protokol studie byl schválen etickou komisí FN Motol, Praha, Česká Republika. Od rodičů všech dětí byl získán písemný informovaný souhlas s účastí ve studii.

U všech účastníků studie byla stanovena výška, hmotnost a vypočítán body mass index (BMI) podle vzorce $(\text{hmotnost v kg})/(\text{výška v m})^2$. Systolický (STK) a diastolický krevní tlak (DTK) byl měřen adekvátně širokou manžetou na pravé paži po 5 minutách klidu u sedícího pacienta pomocí automatického tlakoměru Omron M5-1 (Omron Corporation, Kyoto, Japan). Střední arteriální tlak byl vypočítán jako $\text{DTK} + 1/3 (\text{STK} - \text{DTK})$. U dětí ve skupině ESRD bylo navíc provedeno 24 hodinové ambulantní monitorování krevního tlaku (ABPM- ambulatory blood pressure monitoring).

Všechna antropometrická i biochemická měření byla provedena stejný den jako ultrazvukové vyšetření tepen.

Laboratorní měření

Vzorek žilní krve byl odebrán všem účastníkům po nočním lačnění (12 hod). Byly stanoveny hodnoty lipidového metabolismu- celkový cholesterol a jeho frakce (HDL, LDL); triacylglyceroly (TAG), Apolipoprotein A1 (ApoA1) a B (ApoB), Lipoprotein (a) (Lp (a)). Dále hodnoty urey, kreatininu, kyseliny močové, albuminu, celkového bilirubinu, glukózy, C-reaktivního proteinu (CRP), homocysteinu a ferritinu. Celkový cholesterol, jeho frakce a TAG byly stanoveny autoanalyzárem Hoffman-LaRoche COBAS MIRA za použití enzymatických kitů Boehringer Mannheim. Sérové hodnoty urey, kreatininu, kyseliny močové, albuminu, celkového bilirubinu a glukózy byly měřeny pomocí enzymatických kolorimetrických reakcí. ApoA1 a ApoB byly měřeny imunoturbidimetricky a CRP přímou turbidimetrickou metodou analyzárem Advia 1650 (Bayer, USA). Lipoprotein (a) byl stanoven imunonefelometrickou metodou na analyzáru Image 8000 (Beckmann, Coulter, USA), homocystein analyzárem IMx (Abbott, USA) fluorescenční polarizační immunoassay a ferritin chemiluminiscenční immunoassay na analyzáru Advia Kentaur (Bayer, USA). Aterogenní index plasmy (AIP) byl vypočítán jako $\log(\text{triglyceridy}/\text{HDL cholesterol})$ dle Dobiasova a Frohlich (Dobiasova M., Frohlich J., 1991). Pacienti s hodnotou CRP nad 10 mg/l byli ze hodnocení vyloučeni (4 děti ze skupiny ESRD). Hodnota glomerulární filtrace byla vypočtena na základě Schwartzovy formule (Swartz GJ., et al., 1976).

Ultrazvuková měření

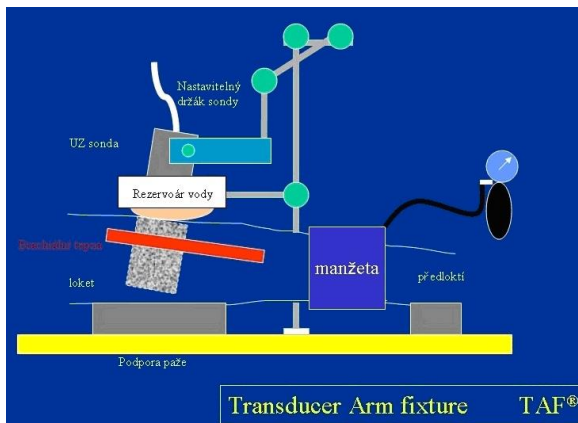
V naší práci jsme použili dvě různá ultrazvuková vyšetření periferního tepenného systému. Metodu flow mediated dilatation a carotis intima-media thickness.

FMD

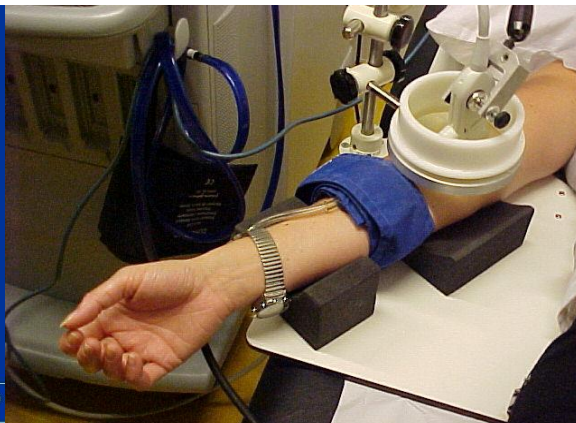
Jak bylo popsáno výše metoda hodnotí vazodilataci vyvolanou zvýšenou produkcí NO endotelovými buňkami v reakci na zvýšení smykového napětí působícího na stěnu cévy při arteficielně vyvolané hyperémii. K vyšetřování jsme použili ultrazvukový přístroj s vysokou rozlišovací schopností (SonoSite Titan, USA) s lineární 7,5- MHz sondou a zařízení "Transducer Arm fixture TAF[®]" (Vascular Imaging Center, University Medical Center Utrecht, the Netherlands). TAF[®] je v podstatě fixátor UZ sondy, který má bránit i drobným pohybům sondy během vyšetření (2x 6,5 minuty) a zároveň zařízení tvoří podporu paže vyšetřovaného a brání jejímu pohybu (Obr 7).

Obr 7. A.- schematický náčrt fixačního zařízení Transducer Arm fixture TAF®
B.- vlastní měření

A.



B.



Protokol vyšetření v naší studii:

- 1) Změření krevního tlaku na nedominantní paži 2x v odstupu 1 minuty
- 2) Na předloktí dominantní paže nasazení manžety rtuťového tonometru
- 3) Přiložení sondy na vyšetřovanou artérii brachialis – její identifikace, ověření průtoků
- 4) 30 s nahrávání klidové fáze na magnetickou pásku SVHS (Super Video Home System)
- 5) Nafouknutí manžety na 60 mm Hg nad průměr systolických tlaků změřených Omronem, na čtyři minuty
- 6) Po 4 minutách vyfouknutí manžety a měření dilatační fáze- 2 minuty
- 7) Po 10 min. opakování bodu 2-6

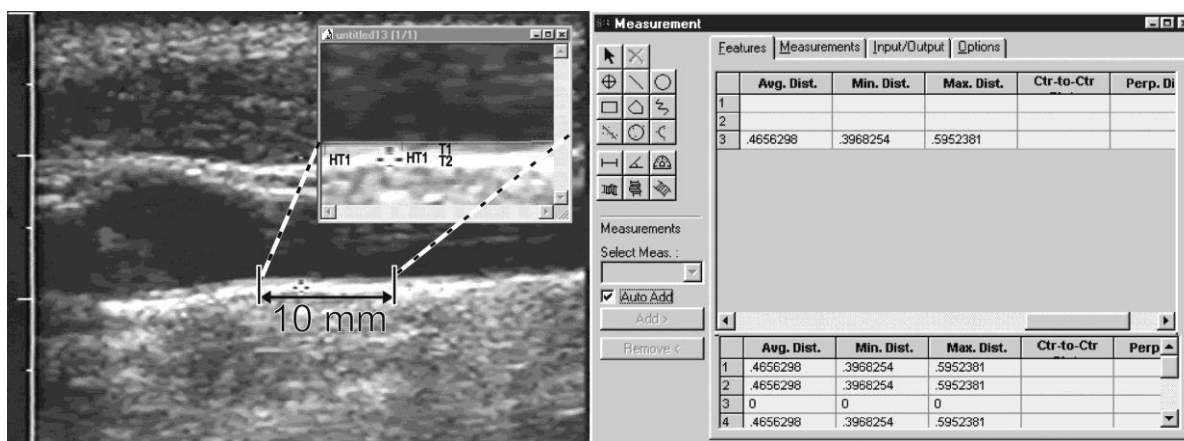
Vlastní měření pak probíhalo off line, pomocí počítačového software ImagePro Plus (Media Cybernetics, USA).

CIMT

Druhá ve studii použitá ultrazvuková metoda je založena na měření tloušťky intimo-mediální dvouvrstvy stěny karotických tepen. Použili jsme stejný ultrazvukový přístroj jako u metody FMD (SonoSite Titan, USA) s lineární 7,5- MHz sondou, veškerá měření byla provedena na vzdálenější stěně společných karotických tepen. U všech pacientů byla zobrazena tloušťka intimo-mediální dvouvrstvy pravé i levé společné karotidy a vyšetření zaznamenáno na magnetickou pásku SVHS (Super Video Home System). Vlastní měření pak byla prováděna offline pomocí počítačového software ImagePro Plus (Media

Cybernetics, USA). Byl vybrán jeden optimální obraz pravé i levé společné karotidy a na zastaveném (frozen) obraze byl zvětšen 10mm dlouhý úsek tepny před karotickým bulbem. CIMT každé z tepen pak byl stanoven jako medián tloušťky intima-media v celém tomto 10 mm dlouhém úseku (Obr 8). Finální hodnota pak byla vypočtena jako aritmetický průměr těchto dvou výsledků pro pravou a levou společnou karotidu. Koeficient variability v předchozích studiích byl 4,9%.

Obr 8. Off-line hodnocení CIMT pomocí software ImagePro Plus.



Identifikace a zvětšení 10mm dlouhého úseku vzdálenější stěny a. carotis communis, jeho zvětšení a vlastní měření.

Statistické zpracování dat

V předložené práci byly spojitě veličiny vyjádřeny jako průměry a jejich standardní odchylky; v případě standardizace na věk a body mass index pak jako průměry a standardní chyby. Kategorické veličiny byly vyjádřeny jako absolutní a relativní frekvence. Pro statistické porovnání rozdílů mezi jednotlivými sledovanými skupinami byl použit nepárový t-test (Student) pro kontinuální veličiny; v případě kategorických veličin byl použit χ^2 (chí kvadrát) test. Pro porovnání rozdílů mezi korelačními koeficienty v jednotlivých skupinách byl použit test pro rovnost korelací (test of equality of correlations coefficients). Všechny testy byly oboustranné a jako významná byla považována velikost hodnoty p menší než 0,05. Pro rozdílnost věku byly všechny významné rozdíly ve všech případech standardizovány na věk.

Výsledky

Hlavní parametry studijní i kontrolní skupiny ukazuje Tabulka 9, odděleně jsou prezentovány výsledky ve skupině transplantovaných dětí (n=31). Vzhledem k tomu, že děti ve skupině ESRD byly signifikantně starší, byla data standardizována na věk.

Tab 9. Antropometrické, klinické, biochemické a ultrazvukové charakteristiky dětí s chronickým selháním ledvin a kontrolní skupiny. Data jsou uváděna jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD) či standardní chyba (SE).

	ESRD všichni n=37	Transplantovaní pacienti (Tx) n=31	Kontroly n=22	P ESRD vs. kontrola	P Tx vs. kontrola
Věk (roky)	14.6±3.3	14.8±3.3	11.0±4.4	0.003	0.002
Chlapci/děvčata (počet)	20/17	16/15	10/12	NS	NS
CIMT (mm)	0.45±0.04	0.44±0.03	0.38±0.03	<0.001	<0.001
Body mass index (kg/m ²)*	20.0±0.7	20.6±0.7	19.4±0.9	NS	NS
Systolický arteriální krevní tlak (mmHg)*	120±1.70	120±1.90	113±2.20	0.027	0.047
Diastolický arteriální krevní tlak (mmHg)*	79±11.30	78±10.60	70±9.80	0.003	0.006
Střední arteriální krevní tlak (mmHg)*	93±1.60	92±1.70	85±2.10	0.006	0.018
Sérový celkový cholesterol (mmol/l)	4.80±1.3	4.60±0.9	4.40±0.7	NS	NS
Triglyceridy (mmol/l)*	1.70±0.10	1.70±0.10	1.40±0.20	NS	NS
HDL cholesterol (mmol/l)	1.21±0.31	1.21±0.31	1.32±0.30	NS	NS
LDL cholesterol (mmol/l)	2.62±0.86	2.56±0.65	2.44±0.76	NS	NS
Aterogenní index plasmy (log(triglyceridy/HDL cholesterol))*	0.11±0.05	0.11±0.05	-0.06 ±0.06	0.036	0.051
ApoB (g/l)	0.81±0.25	0.78±0.16	0.7±0.18	NS	NS
ApoA1 (g/l)	1.23±0.21	1.23±0.21	1.34±0.18	0.041	0.042
Lipoprotein (a) (mg/l)	482±652	449±688	213±251	0.031	NS
C-reaktivní protein (mg/l)**	1.13±1.75	1.05±1.69	0.63±0.42	NS	NS
Urea (mmol/l)	10.6±5.3	9.8±5.1	3.8±0.8	<0.001	<0.001
Kreatinin (μmol/l)	223±203	175±169	67±15	<0.001	<0.001
Glomerulární filtrace (ml/s/1.73 m²)	0.92± 0.38	1.16±0.27	1.69±0.2	<0.001	<0.001
Albumin (g/l)	45.6±4.6	46.6±3.1	46.3±3.7	NS	NS

	ESRD všichni n=37	Transplantovaní pacienti (Tx) n=31	Kontroly n=22	p ESRD vs. kontrola	p Tx vs. kontrola
Ferritin (µg/l)	225±217	188 ±196	47±49	<0.001	<0.001
Homocystein (µmol/l) *	12.2±0.8	12.4±0.8	8.0±1.5	0.024	0.022
Celkový bilirubin (mg/dl)*	9.6±1.3	9.9±1.5	13.1±1.8	NS	NS
Kyselina močová (mg/dl)*	363±16	370±18	295±25	0.024	0.022
Glukóza (mmol/l)	5.1±0.5	5.1±0.5	5.2±1.0	NS	NS

ESRD end-stage renal disease (konečné stadium selhání ledvin), Tučně jsou vyznačeny signifikantní ($p < 0.05$) rozdíly mezi kontrolní a ESRD skupinou. Tx podskupina transplantovaných dětí. *standardizováno na věk; ** čtyři děti ze skupiny ESRD s hodnotami CRP > 10 mg/l byly z analýzy vyloučeny.

U pacientů ve skupině ESRD byla CIMT signifikantně vyšší než v kontrolní skupině. Z dalších sledovaných parametrů, byly ve skupině ESRD nalezeny signifikantně vyšší hodnoty sérového kreatininu, kyseliny močové, homocysteinu, ferritinu, AIP, Lp(a), a krevního tlaku. Naopak hodnoty Apo A1 a dle očekávání též glomerulární filtrace byly ve skupině ESRD signifikantně nižší. V řadě parametrů nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi ESRD a kontrolní skupinou (BMI, celkový cholesterol, triglyceridy, HDL a LDL cholesterol, ApoB, CRP, albumin, celkový bilirubin a glukóza).

Pokud byla ze skupiny ESRD vyjmuta podskupina dětí po úspěšné transplantaci ledviny, nebyl již statisticky významný rozdíl v hodnotách atherogenního indexu plasmy a hladiny Lp(a) oproti kontrolní skupině, zatímco statisticky významný rozdíl v ostatních parametrech zůstal nezměněn.

Následně jsme analyzovali vztah mezi CIMT a dalšími parametry ve skupině transplantovaných dětí a v kontrolní skupině (Tab 10).

Tab 10. Korelace CIMT s kardiovaskulárními rizikovými faktory a dalšími parametry u dětí po transplantaci ledviny a kontrolní skupiny (standardizováno na věk a body mass index)

	Transplantovaní n=31	Kontroly n=22	Rovnost korelačních koeficientů p
Systolický krevní tlak	-0.025	0.301	0.270
Diastolický krevní tlak	-0.308	0.285	0.044
Střední arteriální krevní tlak	-0.239	0.340	0.049
Celkový cholesterol	-0.131	0.139	0.372
Triglyceridy	-0.100	0.283	0.202
HDL cholesterol	-0.071	-0.291	0.460
LDL cholesterol	-0.089	0.249	0.267
Aterogenní index plasmy (log(triglyceridy/HDL cholesterol))	-0.176	0.348	0.083
Apolipoprotein B	-0.030	0.400	0.150
Apolipoprotein A1	-0.176	0.087	0.370
Lp (a)	-0.171	-0.093	0.801
C-reaktivní protein	0.070	-0.094	0.657
Glukoza	-0.022	0.263	0.494
Kreatinin	0.027	-0.100	0.676
Albumin	-0.422*	-0.250	0.239
Ferritin	0.049	0.609*	0.080
Homocystein	0.242	-0.091	0.401
Bilirubin	-0.300**	-0.017	0.345
Kyselina močová	0.087	-0.461	0.075

* p<0.05; ** p<0.05 po zařazení dialyzovaných pacientů (celkový počet =37)

Veškeré korelace byly standardizovány na věk a BMI. Ve skupině dětí po transplantaci ledviny jsme našli signifikantní negativní korelaci s hladinou sérového albuminu, pokud byla skupina rozšířena o PD pacienty (data nejsou prezentována), byla navíc nalezena signifikantně negativní korelace s celkovým bilirubinem ($r = -0,351$, $p < 0,05$).

V kontrolní skupině pak byla nalezena signifikantní pozitivní korelace CIMT s hladinou sérového ferritinu.

Nenalezli jsme žádné další statisticky významné korelace mezi CIMT a jinými sledovanými parametry v obou skupinách, včetně kalcium-fosfátového metabolismu (data nejsou prezentována).

FMD

Druhá v naší studii použitá ultrazvuková metoda, flow-mediated dilatation, se ukázala jako méně vhodná pro vyšetřování dětských pacientů. Již během vyšetření bylo zřejmé, že zejména u mladších dětí nejsme schopni vyšetření validně provést. I u starších dětí jsme však zaznamenali vysokou variabilitu (40-50%) mezi opakovanými měřeními, která nám neumožnila spolehlivou interpretaci získaných dat.

Diskuze

Průkaz preklinické aterosklerózy u dětí ultrazvukovými metodami

V naší studii se podařilo prokázat zvýšenou přítomnost známek preklinické aterosklerózy u dětí v konečném stádiu selhání ledvin oproti skupině zdravých vrstevníků pomocí neinvazivní ultrazvukové metody carotis intima-media thickness. Naše zjištění potvrzují již dříve popisovanou zvýšenou přítomnost známek předčasné aterosklerózy u dětí s ESRD. Hodnoty CIMT námi pozorované byly jak ve studijní tak i kontrolní skupině velmi podobné výsledkům prezentovaným v předešlých studiích (Mitsnefes MM., et al., 2004; Litwin M., et al., 2005; Civilibal M., et al., 2007; Delucchi A, et al., 2008; Civilibal M., et al., 2009; Basiratnia M., et al., 2010).

Oproti tomu Groothoff a spolupracovníci prokázali ve své práci z roku 2002 ve skupině ESRD pacientů sníženou roztažitelnost karotických tepen (distensibility of carotis arteries), avšak bez zvýšení CIMT u těchto nemocných (Groothoff JW., et al., 2002). Účastníci této studie byli však starší než v ostatních zmiňovaných a v potaz také nebyly brány žádné metabolické faktory. Diskrepanci ve výsledcích by tak bylo možno vysvětlit potenciální odlišností vyšetřovaných skupin včetně kontrolní skupiny, do které byli zavzati také příbuzní pacientů ze skupiny ESRD. Toto vysvětlení rovněž podporuje fakt, že hodnoty CIMT prezentované ve studii Groothoffa jsou jak ve studijní tak kontrolní skupině významně vyšší oproti ostatním zmíněným studiím.

Druhá v naší studii použitá ultrasonografická metoda, flow mediated dilatation brachiální artérie, se ukázala jako méně vhodná pro vyšetřování dětských pacientů. Jak bylo zmíněno výše, již během vyšetření bylo zřejmé, že zejména u mladších dětí nejsme schopni vyšetření

validně provést. Vzhledem k tomu, že studie se účastnily i děti ve věku 3-5 let, nebylo možno zajistit, aby vydržely 4 minuty zaškrcení ruky manžetou, které je velmi nepříjemné i dospělému a následně 2 minuty měření, to vše bez nejmenšího pohybu. Možná i z tohoto důvodu je publikovaných studií FMD v dětském věku minimum. I v těch několika málo známých pracích jsou účastníci studie vždy minimálně školního věku (Celermajer DS., et al., 1992; Jarvisalo MJ., et al., 2002; Jarvisalo MJ., et al., 2004; Lilien MR., et al., 2003; Wilson AC., et al., 2008).

I u starších dětí jsme však zaznamenali vysokou variabilitu mezi opakovanými měřeními (40-50%), což může být způsobeno poměrně malým souborem našich pacientů, nebo variabilitou vyšetřovací metody. Výsledky vyšetření FMD jsme se z těchto důvodů rozhodli nepoužít.

Z pohledu klinického pediatra má velký význam potvrzení vysoké výpovědní hodnoty metody CIMT ke stanovení zvýšeného rizika rozvoje aterosklerózy již v dětském věku. Farmakologická léčba dětí například s poruchou metabolismu lipidů je v pediatrii kontroverzním tématem a možnost průkazu již počínajícího rozvoje aterosklerotických změn by mohla napomoci při rozhodování zda a které dítě již eventuálně začít léčit farmaky ke snižování hladin lipidů. Naopak metodu FMD, byť v několika pediatrických studiích úspěšně použitou, osobně za vhodnou pro vyšetřování zejména menších dětí z výše uvedených důvodů nepovažuji.

Klasické a netradiční kardiovaskulární rizikové faktory

Klasické kardiovaskulární rizikové faktory krevní tlak a ukazatele reverzního transportu cholesterolu byly ve studijní skupině méně příznivé než u dětí s normální funkcí ledvin. Také rizikové faktory nověji diskutované, jako jsou hladiny homocysteinu a ferritinu, byly ve skupině dětí s ESRD vyšší než u jejich zdravých vrstevníků.

Téměř s jistotou je však možno tvrdit, že rozdíly v hodnotách homocysteinu souvisí se sníženou renální funkcí nefrologických pacientů, zatímco zvýšené hodnoty ferritinu jsou pravděpodobně důsledkem předešlé substituce či léčby anémie nebo přítomností mikrozánetu.

Vyšší hodnoty krevního tlaku u dětí s chronickým ledvinným onemocněním, přes často i kombinovanou antihypertenzní léčbu, byly opakovaně popsány v řadě studií (Mitsniefes MM., et al., 2004; Seeman T., et al., 2004; Poyrazoglu HM., et al., 2007). Je vysoce pravděpodobné, že tato skutečnost je primárně způsobena renálním onemocněním a léčbou imunosupresivou.

V otázce dyslipidemie jsme našli pouze méně příznivé hodnoty pro markéry reverzního transportu cholesterolu, především nižší hodnoty ApoA1 a zvýšený AIP. Pokud byly ze skupiny ESRD vyjmuty děti po transplantaci ledviny, aterogenní index plasmy se stal v této podskupině pouze hraničně statisticky významným, generalizace těchto zjištění zůstává tedy nejasná. U pacientů s ESRD byla popsána celá řada odchylek ve složení, struktuře i metabolismu lipoproteinů, které se liší nejen v rámci odlišného typu léčby nahrazující funkce ledvin, ale i mezi jednotlivými studii zabývajícími se touto problematikou. Nečastějšími patologickými nálezy ve složení krevních lipidů u pacientů s renálním postižením, jsou hypertriglyceridemie, nízký HDL cholesterol a redukce velikosti LDL částic ve smyslu zvýšení koncentrace malých denzních LDL.

Nepřehlednost v otázce dyslipidemie u CHRI navíc zvyšují zmíněné matoucí faktory jako je malnutrice u nefrologických pacientů a s ní související nízké hladiny cholesterolu (Ritz E., 1996), což je v poslední době zasazováno do širšího kontextu v souvislosti s fenoménem “reverzní epidemiologie” (Nurmohamed SA., Nube MJ., 2005).

Ostatní rozdíly v parametrech mezi studijní a kontrolní skupinou jsou zjevně způsobeny sníženou glomerulární filtrací (urea, kyselina močová a homocystein) a/nebo léčbou komplikací základního onemocnění (feritin).

Ukazatele preklinické aterosklerózy

Hlavními determinanty preklinické aterosklerózy se v naší skupině dětí s chronickým renálním onemocněním ukázaly být nízké hladiny albuminu a bilirubinu. U zdravých dětí kontrolní skupiny byl jediným parametrem, který silně pozitivně koreloval s aterosklerotickými změnami ferritin. V žádné z vyšetřovaných skupin jsme nenalezli signifikantní souvislost mezi mírou aterosklerotického postižení a jakýmkoli klasickým kardiovaskulárním rizikovým faktorem.

Náš nález inverzního vztahu mezi hladinou albuminu a hodnotou CIMT byl již popsán v minulosti (Litwin M., et al. 2005) a vysvětlen špatným stavem výživy vyšetřovaných osob (malnutrice). V současné době ukázaly studie dospělých hemodialyzovaných pacientů, že lehká hypertenze, hypercholesterolemie a nadváha se zdají být u této skupiny pacientů dokonce protektivní a jsou spojeny se zlepšeným přežíváním (Nurmohamed SA., Nube MJ., 2005). Tento nově zjištěný fenomén byl nazván “reverzní epidemiologií”, za jeho příčinu je považován komplex jevů malnutrice- zánět- ateroskleróza.

Pokud víme, je naše sdělení prvním popisující inverzní korelaci mezi preklinickou aterosklerózou a hodnotami bilirubinu u dětí s ESRD. Současné experimentální i humánní

studie prokázaly, že bilirubin hraje důležitou roli v ochraně buněk jako fyziologický protektor poškození oxidativním stresem. (Sedalk TW., Snyder SH., 2004; Jansen T., et al., 2008). Předpokládá se, že oxidační stress je významným činitelem při vzniku a progresi aterosklerotického procesu. Bilirubin krevního séra může přímo antagonizovat oxidační podněty v krevním řečišti a snižovat jejich nežádoucí účinek na LDL částice (Neuzil J., Stocker R., 1994; Jansen T., et al., 2008).

Negativní korelace mezi hodnotami sérového bilirubinu a mírou preklinické aterosklerózy u našich pacientů s ESRD tak může znamenat jeho důležitou roli jakožto fyziologického antioxidantu krevního séra.

Ve skupině zdravých CIMT pozitivně korelovalo s hodnotou ferritinu. Domníváme se, že pro rozvoj časných stádií aterosklerózy může být u dětí s chronickým selháním ledvin důležitým faktorem anti-oxidační kapacita, zatímco u zdravých kapacita pro-oxidační. V rámci naší studie jsme nenalezli souvislost mezi preklinickou aterosklerózou a žádným z klasických kardiovaskulárních rizikových faktorů ve skupině ESRD ani u zdravých kontrol. Především zvýšený krevní tlak byl v některých předešlých studiích shledán statisticky významným v korelaci s přítomností preklinické aterosklerózy, minimálně ve skupině nefrologicky nemocných dětí. (Mitsnefes MM., et al., 2004; Civilibal M., et al., 2009; Poyrazoglu HM., et al., 2007). Tento rozdíl oproti našim pozorováním by mohl být zapříčiněn různými vlastnostmi studovaných skupin. Například ve zmíněných pracích tureckých autorů (Poyrazoglu, Civilibal), byly sledované děti léčeny chronickou dialýzou, v našem souboru především děti po transplantaci ledviny. Vysvětlením rozdílných výsledků tak může být různě dlouhá expozice zvýšenému krevnímu tlaku či ostatním rizikovým faktorům renálního onemocnění a jeho léčby.

Nedostatky a přínos studie

Jedná se průřezovou studii, jejíž omezení spatřujeme v relativně malém počtu účastníků a jejich heterogenitě. Ta je způsobena jak různými příčinami renálního selhání tak i délkou jeho trvání a častou farmakologickou léčbou. Tyto faktory se mohou podílet na některých hraničních hodnotách, stejně jako na rozdílech mezi našimi výsledky a některými předešlými studiemi. Přesto však ve srovnání s jinými podobnými pracemi (Delucchi A, et al., 2008; Bilginer Y., et al., 2007) je náš soubor pacientů početnější a dosahuje obdobného počtu účastníků jako většina publikovaných studií s touto problematikou (Mitsnefes MM., et al., 2004; Civilibal M., et al., 2007; Poyrazoazlu., et al., 2007).

Dodatečný přínos naší studie spatřujeme v ověření široké škály klasických i netradičních kardiovaskulárních rizikových faktorů, včetně hodnot bilirubinu a aterogenního indexu plasmy. Za přínosné považujeme také ověření možností vyšetření preklinické aterosklerózy neinvazivními ultrazvukovými metodami. Zatímco metodu FMD se nám nepodařilo úspěšně při vyšetřování našich pacientů použít, metoda CIMT se ukázala jako velmi vhodnou a průkaznou ve vyšetřování časných projevů aterosklerózy i u malých dětí.

Závěr

Na základě našich výsledků je možno říci, že antioxidační kapacita organismu reprezentovaná hodnotami sérového bilirubinu, stejně jako hladiny sérového albuminu vypovídající o stavu výživy mohou být významná v časných stádiích rozvoje aterosklerózy u dětí s chronickým selháním ledvin včetně těch po renální transplantaci a léčených antihypertenzivy.

Proto by léčba dětí s chronickým selháním ledvin zaměřená výhradně na klasické rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění nemusela být jedinou a dostačující metodou ke snížení kardiovaskulárních rizik v této skupině pacientů.

Na základě našich výsledků se domníváme, že budoucí prospektivní klinické výzkumy zaměřené na snižování kardiovaskulárních rizik u mladých osob s renálním selháním by se měly pokusit vzít v potaz také otázku role nutričního stavu a antioxidantů.

Proteinurie jako nezávislý rizikový faktor aterosklerózy

Dodatečně jsme analyzovali data pacientů skupiny ESRD (n=37), s úmyslem stanovit hodnoty proteinurie u těchto pacientů v době ultrazvukového vyšetření CIMT a zjistit případnou souvislost předčasného aterosklerotického postižení tepen s přítomností a kvantitou proteinurie jakožto dalšího významného rizikového faktoru kardiovaskulárního onemocnění.

Hodnota proteinurie byla stanovena ze vzorku moče z 24 hod sběru ($\text{mg}/\text{m}^2/\text{den}$).

Vztah mezi CIMT a proteinurií jsme hodnotili stanovením korelačních koeficientů a statistickou závislost jsme hodnotili metodou mnohotné regrese- do statistického modelu byl kromě CIMT a proteinurie zařazen i věk sledovaných dětí.

Zjistili jsme, že hodnota proteinurie u těchto pacientů významně pozitivně koreluje s tloušťkou dvojvrstvy intima-media ($r=0.478$) a tento vztah je vysoce statisticky významný ($p=0.003$) (Obr 9).

Navíc, jsme pozorovali výrazný rozdíl tohoto vztahu u obou pohlaví. V případě chlapců (n=20) byla nalezena statisticky vysoce významná korelace ($r=0.724$, $p<0.001$) (Obr 10).

Oproti tomu v případě dívek (n=17) jsme významnou korelaci proteinurie s hodnotou CIMT neprokázali ($r=0.377$, $p=0.152$) (Obr 11).

Tyto výsledky podporují známý fakt, že proteinurie je nezávislým silným rizikovým faktorem rozvoje kardiovaskulárního onemocnění a míra rozvoje preklinického aterosklerotického postižení tepen odpovídá velikosti ztrát bílkovin do moči. V našem souboru pacientů jsme tuto souvislost našli pouze ve skupině chlapců, u dívek jsme signifikantní korelaci neprokázali (Tab 11).

Možným vysvětlením tohoto nálezu by mohla být v případě dívek již zvýšená hladina ženských pohlavních hormonů- estradiolu a dalších; většina dívek byla v době vyšetření v adolescentním věku (median věku 15 let). Zvýšená hladina ženských pohlavních hormonů má známý protektivní charakter na rozvoj aterosklerotického poškození tepen a i přes přítomnost proteinurie při renálním onemocnění by zde již mohla působit případná ochrana cévní stěny ženskými pohlavními hormony. Vzhledem k tomu, že jsme hladiny hormonů v této skupině neměřili, jedná se o spekulativní vysvětlení. Nicméně v aktuálně publikované práci (Pitha J., et al., 2012) jsme skutečně prokázali, že hlavní rizikové období u žen pro progresi preklinické aterosklerózy je až v období perimenopauzy, tedy kolem 45-50 let. Další literární opora pro náš nálezný a vysvětlení jsou četné literární údaje vysvětlující, proč jsou ženy v reprodukčním věku podstatně méně postiženy projevy aterosklerózy než muži,

zatímco po menopauze se postižení obou pohlaví postupně vyrovnává. Holandští autoři dokonce vypočetli, že s každým rokem, o který se menopauza oddálí, se snižuje kardiovaskulární mortalita o 2 % (Van der Schouw YT., et al., 1996).

Mechanismus antiaterogenního působení estrogenů je velmi komplexní, ovlivňuje jak lipidové spektrum, tak metabolické procesy cévní stěny. Estrogeny zvyšují vychytávání LDL-cholesterolu v játrech, čímž dochází k jeho zvýšenému odstraňování z cirkulace a metabolizaci.

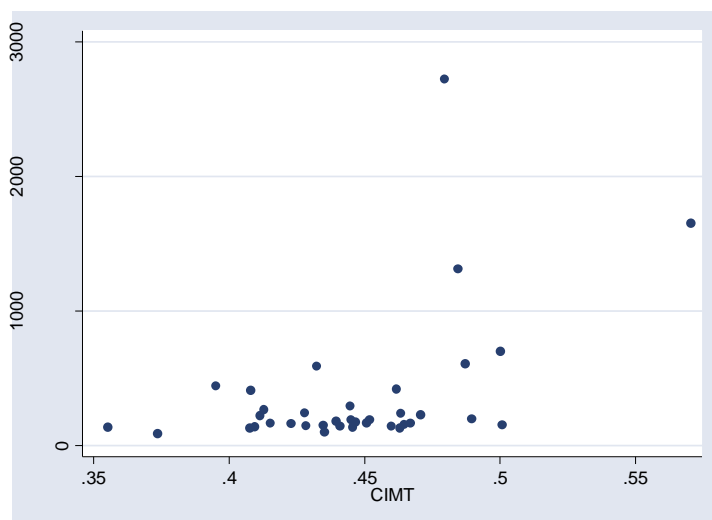
Současně tlumí aktivitu jaterní endoteliální lipázy, což má za následek snížené odbourávání HDL cholesterolu. Působení na cévní stěnu je považováno za ještě důležitější než ovlivnění krevních lipidů. Estrogeny inhibují buněčnou proliferaci po poškozeních cévní stěny, snižují v ní akumulaci cholesterolu, podporují syntézu vazodilatačních molekul (oxidu dusnatého, prostacyklinu, cyklického adenosinmonofosfátu) a inhibují syntézu vazokonstrikčních faktorů i faktorů indukujících aterosklerózu (endotelin, angiotenzin II, reninová aktivita, aktivita angiotenzin konvertujícího enzymu a katecholaminy). Kromě toho estrogeny inhibují mitogeny navozenou proliferaci hladkých svalů cévní stěny, srdečních fibroblastů a glomerulárních mezangiálních buněk. Důležitým účinkem estrogenů je jejich antioxidační a vazodilatační působení. Pokud se však již aterosklerotické změny v cévě vyvinuly, mohou estrogeny uplatnit i svou negativní úlohu, kdy získává převahu jejich protrombotický účinek, jež vede k destabilizaci přítomných plátů (Marek J., 2011).

Tab 11. Korelace CIMT s proteinurií

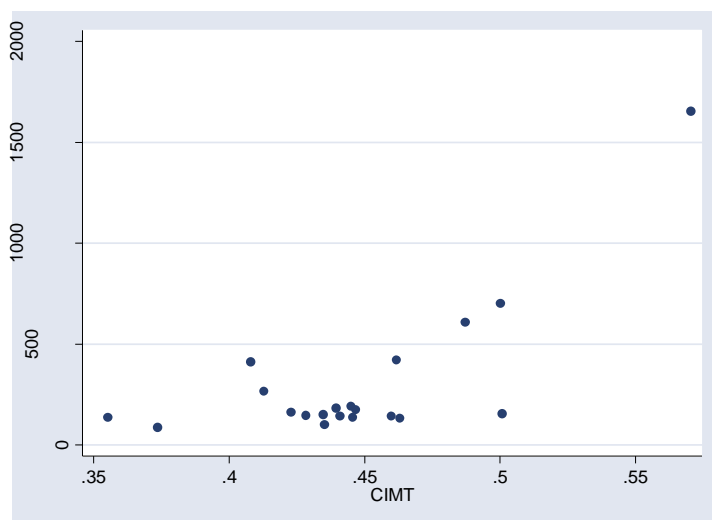
Skupina	r	p
ESRD všichni (n=37)	0.4778	0.003
ESRD dívky (n= 17)	0.3768	0.152
ESRD chlapi (n=20)	0.7238	<0.001

ESRD- end-stage renal disease, konečná fáze selhání ledvin, r- korelační koeficient, p- hladina významnosti

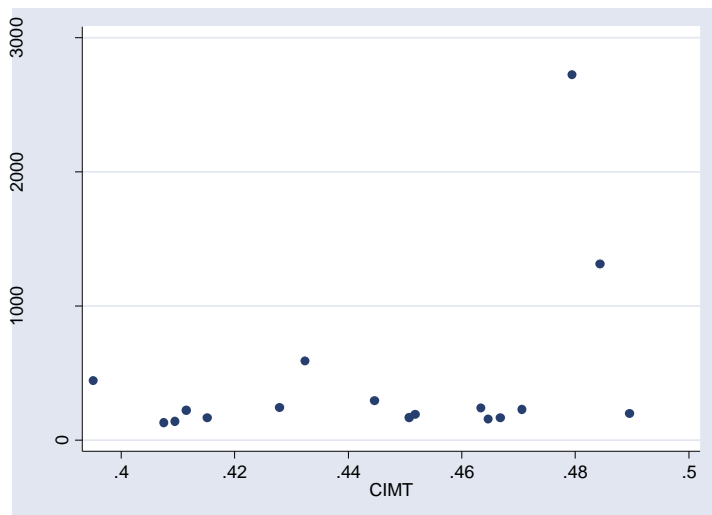
Obr 9. Korelace proteinurie s CIMT ve skupině ESRD pacientů (n=37)



Obr 10. Korelace proteinurie s CIMT v podskupině chlapců (n=20)



Obr 11. Korelace proteinurie s CIMT v podskupině dívek (n=17)



Závěr

Nalezli jsme významnou souvislost mezi proteinurií a preklinickou aterosklerózou hodnocenou ultrazvukovou metodou CIMT u dětí v chronickém renálním selhání. Statisticky významně se však tato asociace projevila pouze ve skupině chlapců. U dívek jsme souvislost neprokázali. Je možné, že zvýšená hladina estrogenů, již v této skupině předpokládáme (median věku 15 let), uplatňuje svou protektivní úlohu v ochraně cévní stěny a u dívek s chronickým renálním selháním pozitivně modifikuje proaterogenní vliv proteinurie.

III. Snížení proteinurie během intenzivní antihypertenzní léčby u dětí po transplantaci ledviny

Hypotéza

Proteinurie je spolu s hypertenzí známý nezávislý rizikový faktor zhoršeného přežívání štěpu stejně jako morbidity a mortality dospělých pacientů po úspěšné transplantaci ledviny. I v dětské populaci transplantovaných může být proteinurie snížena podáváním inhibitorů ACE a snížením krevního tlaku, stejně jak to již bylo prokázáno u dospělých pacientů.

Cíl

Stanovit ve skupině dětských pacientů po transplantaci ledviny změny ve velikosti proteinurie během intervenční studie zaměřené na léčbu hypertenze.

Metodika

45 dětských pacientů po transplantaci ledviny léčených na Pediatrické klinice FN v Motole bylo vyšetřeno pro možnost zařazení do studie. Kritéria pro zařazení byla: minimálně 6 měsíců po úspěšné transplantaci; bez epizody akutní rejekce v posledních 3 měsících.

Proteinurie byla stanovena z 24 hodinového sběru moči. Krevní tlak (TK) byl měřen pomocí 24 hodinového ambulantního monitorování TK (ABPM; oscilometrický monitor SpaceLabs 90207 nebo 90217) a byl vyjádřen jako standard deviation score (SDS= Z-score).

Hypertenze byla definována jako průměrný systolický či diastolický tlak během dne nebo noci roven nebo vyšší než 95. percentil pro zdravé stejně staré děti, a nebo užívání jakéhokoli antihypertenzního léčiva včetně diuretik. Hypertenzi jsme pak u jednotlivých pacientů označili jako neléčenou (TK roven nebo nad 95. percentil u pacientů bez antihypertenzní léčby), nekontrolovanou (TK roven nebo nad 95. percentil u antihypertenzně léčených pacientů) a kontrolovanou (TK nižší než 95. percentil u pacientů s antihypertenzní léčbou).

U dětí s neléčenou či nekontrolovanou hypertenzí byla její léčba zintenzivněna přidáním antihypertenziva (prvního nebo do kombinace. Léčiva byla volena z následujících kategorií: ACEI (inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu), beta-blokátory, blokátory kalciových kanálů a diuretika. Konkrétní léčivo bylo u jednotlivých pacientů voleno empiricky.

Rok po změně antihypertenzní terapie byla u všech dětí stanovena proteinurie, ABPM a hodnota glomerulární filtrace (GFR, stanovená na základě sérového kreatininu pomocí Schwarzova vzorce). Studie byla schválena místní etickou komisí Fakultní nemocnice Motol, Praha, Česká Republika.

Cílem naší studie bylo stanovit změny ve velikosti proteinurie v podskupině dětí se ztrátou bílkovin $>200\text{mg}/\text{m}^2/\text{den}$, což zhruba koresponduje s hodnotou $>300\text{ mg}/\text{den}$ u dospělých. Data jsou uváděna jako medián, směrodatná odchylka (SD-standart deviation) či procenta. Statistická analýza byla provedena pomocí statistického software SPSS. $P<0.05$ bylo považováno za statisticky významný rozdíl mezi hodnotou 1 rok před zahájením studie, zahájením a po 1 roce za použití Wilcoxon signed rank test.

Výsledky

Dvanáct dětí (7 chlapců, 5 děvčat) splnilo kritéria pro zařazení do studie.

Důvody pro vyloučení byly: krátký interval od transplantace (< 6 měsíců, n=7), epizoda akutní rejeckce v předešlých 3 měsících (n=2), nemožnost 24 hod sběru moči (n=3), nebo proteinurie <200 mg/m²/den (n=21). Průměrný věk pacientů byl 13 ±3.8 let (rozpětí 5.4-18.9 let), střední čas od transplantace 3.1 ±2.6 let (rozpětí 0.5-8.9 let). Všechny děti byly příjemci kadaverózního štěpu, 11 z nich bylo transplantováno poprvé.

Všichni pacienti kromě jednoho byli léčeni kortikosteroidy a inhibitory kalcineurinu (Cyklosporin a Tacrolimus). Navíc všechny děti s výjimkou dvou užívaly azatioprin či mykofenolát mofetil. U pěti z těchto dětí se vyskytla minimálně jedna epizoda akutní rejeckce štěpu, u jednoho biopsií potvrzená chronická rejeckce. Rekurence fokálně segmentální glomerulosklerózy ve štěpu se nevyskytla u žádného pacienta. Deset dětí bylo léčeno antihypertenzivy, pouze jedno z nich užívalo ACEI. Hypertenze byla dignostikována u 11 dětí, ať už neléčená (8%), nekontrolovaná (50%) či kontrolovaná (33%).

Proteinurie

Rok před zahájením studie byl u těchto pacientů medián proteinurie 226 mg/m²/den (rozpětí 41-1478 mg/m²/den) a při zahájení studie se statisticky významně nezměnil (278 mg/m²/den, rozpětí 205-1264 mg/m²/den). Po roce od zahájení studie však došlo k jejímu signifikantnímu poklesu na 199 mg/m²/den (rozpětí 65-749 mg/m²/den, p< 0.05).

Antihypertenzní léčba a krevní tlak

Počet antihypertenziv se zvýšil z 1.6 ±1.0 na 2.2 ± 0.9 léčiva na pacienta (p< 0.05). Užití jednotlivých lékových skupin se signifikantně nezměnilo: ACEI 8% (n=1) na počátku studie oproti 16% (n=2) po 1 roce, beta blokátory 67% vs 83%, blokátory kalciových kanálů 50% vs 75% a diuretika 33 vs. 42% (p= NS). Průměrný systolický a diastolický krevní tlak během dne a diastolický TK v noci se po roce studie signifikantně nezměnily. Průměrný systolický TK během noci se signifikantně snížil z 1.6 ± 1.54 SDS na počátku na 1.04 ± 0.97 SDS po 1 roce (p <0.05). GFR se po 1 roce signifikantně nezměnila (77 ± 20 vs 70 ±21 ml/min/1.73 m²) (Tab 12) Nenalezli jsme signifikantní korelaci mezi změnami v proteinurii a hodnotách krevního tlaku či glomerulární filtrace.

Tab 12. Proteinurie, kontrola hypertenze, krevní tlak, antihypertenzní léčba a funkce štěpu u jednotlivých pacientů během studie.

Parametry na počátku studie a po 1 roce									
Pacient č.	Protein-urie mg/m ² /d	Hypertenze kontrolovaná / nekontrolovaná / neléčená	ABPM Denní STK SDS	ABPM Denní DTK SDS	ABPM Noční STK SDS	ABPM Noční DTK SDS	Antihypertenziva počet	ACE I	Funkce štěpu ml/min/ 1.73m ²
1	252	N	3.29	3.62	4.8	5.24	3	NE	98
	132	K	0.99	-0.52	1.24	0.35	4	ANO	69
2	278	N	0.4	0.27	2.32	3.55	1	NE	87
	65	K	-0.28	0.93	-0.49	1.38	2	NE	88
3	220	N	1.21	0.35	1.81	0.97	1	NE	46
	196	K	-0.57	-1.13	1.11	1.43	2	NE	39
4	303	NT	0.26	-1.12	1.2	0.27	0	NE	108
	207	NT	0.93	-1.0	0.69	-1.10	0	NE	88
5	293	K	-0.96	-0.36	-0.08	1.34	2	ANO	52
	468	N	0.88	0.11	2.09	2.66	2	ANO	51
6	1186	NL	2.39	1.85	3.43	3.31	0	NE	59
	749	K	-1.71	-1.84	-0.03	0.52	3	NE	40
7	287	K	-0.86	-2.12	-0.45	-0.78	2	NE	90
	245	K	-0.2	-2.27	0.05	-1.16	2	NE	86
8	238	K	-1.04	-0.49	0.01	1.24	2	NE	82
	176	N	0.94	0.2	1.7	0.83	2	NE	77
9	252	K	-0.49	0.5	0.24	0.69	2	NE	100
	199	K	0.28	1.24	0.43	1.65	2	NE	107
10	1066	N	1.92	0.83	1.93	0.97	3	NE	66
	565	N	1.58	0.81	2.46	1.97	3	NE	52
12	205	N	1.21	-0.55	2.15	0.39	2	NE	61
	119	N	1.63	-0.4	2.37	1.12	2	NE	74

Zlepšené parametry jsou zvýrazněny tučně. Hypertenze: nekontrolovaná N, kontrolovaná K, neléčená NL; Normotenze NT. TK krevní tlak; STK systolický krevní tlak; DTK diastolický krevní tlak; SDS standart deviation score; ACEI- inhibitory angiotensin-konvertujícího enzymu.

Diskuze

Proteinurie se v poslední době stává důležitým terapeutickým cílem u pacientů po transplantaci ledviny (Wingen AM., et al., 1997; Roodnat JL., et al., 2001; Reichel H., et al., 2004). Společně s hypertenzí je důležitým rizikovým faktorem pro chronickou nefropatii štěpu, nejčastější příčinou pozdního selhání štěpu, stejně jako pro mortalitu pacientů.

Prokázali jsme, že proteinurie je častou komplikací rovněž v dětském věku a je spojena s hypertenzí a rejekcemi štěpu (Seeman T., et al., 2005). U dospělých pacientů po transplantaci ledviny se snižování TK samo o sobě a užívání ACEI ukázalo jako významné při snižování proteinurie (Traindl O., et al., 1993). Pokud víme, nebyla zatím prezentována studie, která by ukázala změny proteinurie během sledování dětských pacientů po transplantaci ledviny. V naší prospektivní intervenční studii zvýšení intenzity antihypertenzní léčby u podskupiny dětí se ztrátou proteinů do moči vyšší než 200mg/m²/den vedlo k významnému poklesu proteinurie. Víme tak, že zvýšený počet antihypertenzních léčiv a s tím spojené snížení TK vede k signifikantnímu snížení proteinurie. Překvapivě u naší skupiny dětí nedošlo k signifikantnímu nárůstu předepisování ACEI. Toto zjištění poukazuje na fakt, že proteinurie může být snížena nejen specifickou lékovou skupinou (ACEI), ale rovněž snížením krevního tlaku samotného, nezávisle na typu léčiva. Toto pozorování je ve shodě se studiemi u pacientů s chronickým onemocněním nativních ledvin (Gansevoort RT, et al., 1995).

Funkce štěpu nebyla signifikantně snížena 1 rok po zahájení studie, což můžeme považovat za pozitivní známku pro dlouhodobou funkci a přežívání štěpu.

Otázka, zda intenzivní antihypertenzní léčba snižující nejen krevní tlak, ale i proteinurii (oba jsou rizikovými faktory pro chronickou nefropatii štěpu) povede k lepšímu přežívání štěpů a pacientů vyžaduje delší sledování než byla naše 2 letá studie.

Závěr

V naší dvouleté intervenční studii u dětských příjemců ledvinného štěpu intenzivní antihypertenzní léčba signifikantně snížila proteinurii nezávisle na lékové skupině použitých antihypertenziv.

Závěrečná diskuze

Pro klinické studie prezentované v této práci jsme modifikovali dříve popsanou ultrazvukovou metodu (Pitha J., 1999) vyšetření preklinické aterosklerózy karotických tepen i její off-line hodnocení dle současných poznatků. Vzhledem k tomu, že v předchozích pracích bylo zjištěno, že měřením obou- pravé i levé společné karotidy se významně snižuje variabilita opakovaných měření (koeficient variability 8.6% jedna karotida vs 5.3% pravá i levá karotida) (Schmidt C., 1999), i naše měření u každého pacienta probíhala vždy na obou společných karotidách. Koeficient variability opakovaného měření CIMT u jednoho vyšetřujícího, který jsme hodnotili v rámci studie 3PMPs byl v našem případě 4,9%, což odpovídá dříve prezentovaným hodnotám jiných autorů 4.4-5.1% (Belcaro G., 1993), 5.4-5.8% (Salonen R., 1991). V těchto pracích bylo navíc zjištěno, že k výrazně vyšší variabilitě ve výsledcích CIMT dochází, pokud měření provádí více než jeden vyšetřující. Variabilita mezi třemi vyšetřujícími ve výše citovaných pracích byla 10,5% (Salonen), 8,45% (Belcaro). V práci Salonena byla jen 4% z celkové variability měření způsobena rozdíly v opakovaných měřeních jedním vyšetřujícím, zatímco 96% bylo na úkor variability mezi několika vyšetřujícími. V každé z našich studií veškerá měření CIMT prováděl jediný vyšetřující. Přestože v několika publikovaných pracích byla i u dětských pacientů preklinická ateroskleróza vyšetřována pomocí ultrazvukové metody FMD (Lilien MR., et al., 2003; Wilson AC., et al., 2008), z naší zkušenosti je vhodnost tohoto vyšetření pro dětský věk sporná a metodu CIMT hodnotíme jako výrazně spolehlivější.

V naší práci u dětí s chronickým renálním selháním jsme ve shodě s většinou dříve publikovaných zahraničních studií prokázali signifikantně vyšší CIMT ve skupině nefrologických pacientů oproti skupině zdravých vrstevníků (Mitsnefes MM., et al., 2004; Litwin M., et al., 2005; Civilibal M., et al., 2007; Poyrazoglu HM., et al., 2007; Bilginer Y., et al., 2007; Delucchi A, et al., 2008; Civilibal M., et al., 2009; Basiratnia M., et al., 2010). Nenalezli jsme souvislost mezi preklinickou aterosklerózou a žádným z klasických rizikových faktorů a to ve skupině ESRD, ani u zdravých kontrol. Především zvýšený krevní tlak byl v některých předešlých studiích shledán statisticky významným v korelaci s přítomností preklinické aterosklerózy, minimálně ve skupině nefrologicky nemocných dětí. (Mitsnefes MM., et al., 2004; Civilibal M., et al., 2009; Poyrazoglu HM., et al., 2007). Tento rozdíl oproti našim pozorováním může být zapříčiněn různými vlastnostmi studovaných skupin. Například ve zmíněných pracích tureckých autorů (Poyrazoglu, Civilibal), byly

sledované děti léčeny chronickou dialýzou, v našem souboru především děti po transplantaci ledviny. Vysvětlením rozdílných výsledků tak může být různě dlouhá expozice zvýšenému krevnímu tlaku či ostatním rizikovým faktorům renálního onemocnění a jeho léčby. Náš náález inverzního vztahu mezi hladinou albuminu a hodnotou CIMT byl již popsán v minulosti (Litwin M., et al. 2005) a vysvětlen špatným stavem výživy vyšetřovaných osob (malnutrice), eventuelně přímou úlohou v ukládání kalcia zvýšením jeho volné precipitabilní frakce.

Pokud víme, je naše sdělení prvním popisující inverzní korelaci mezi preklinickou aterosklerózou a hodnotami bilirubinu u dětí s ESRD. Současné experimentální i humánní studie prokázaly, že bilirubin hraje důležitou roli v ochraně buněk jako fyziologický protektor poškození oxidačním stresem. (Sedalk TW., Snyder SH., 2004; Jansen T., et al., 2008). Vzhledem k tomu, že oxidační stres je dnes pokládán za významný činitel při vzniku a progresi aterosklerotického procesu, domníváme se, že negativní korelace mezi hodnotami sérového bilirubinu a mírou preklinické aterosklerózy u našich pacientů s ESRD může znamenat jeho důležitou roli jakožto fyziologického antioxidantu krevního séra.

Pokud víme, nebyla do dnešního dne u dětí prezentována souvislost mezi zvýšením CIMT a hodnotou proteinurie, dalším netradičním rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění, který se v naší práci ukázal jako statisticky významný.

Překvapivé pro nás bylo zjištění, že po rozdělení vyšetřované skupiny podle pohlaví, se objevil výrazný rozdíl v korelaci tohoto parametru mezi chlapci a dívkami. Zatímco ve skupině chlapců se statistická významnost korelace ještě výrazně zvýšila, ve skupině dívek nebyla již dále signifikantní. Domníváme se, že vysvětlením tohoto nálezu by mohla být zvýšená hladina ženských pohlavních hormonů, ve skupině dívek, kterých většina byla v době vyšetření v pubertálním věku (median 15 let). Přestože jsme hladiny hormonů u těchto pacientek nestanovovali a vysvětlení je pouze spekulativní, prokázali jsme v naší první studii, že hlavní rizikové období pro progresi aterosklerotického postižení v ženské populaci je až období menopauzálního přechodu a je skutečně možné, že se ochranný efekt ženských pohlavních hormonů na cévní stěnu uplatňuje pozitivně u dívek s chronickou renální insuficiencí.

Jeden z námi nalezených rizikových faktorů korelujících významně s rizikem předčasného aterosklerotického postižení tepen (proteinurii) jsme se pokusili ovlivnit v intervenční studii u dětí po transplantaci ledviny. Prokázali jsme, že intenzivní léčbou zvýšeného krevního tlaku je možno proteinurii významně snížit a to překvapivě nejen inhibitory angiotensin

konvertujícího enzymu, jak bylo opakovaně popsáno u dospělých (Traindl O., 1993) ale antihypertenzivy různých lékových skupin.

Domníváme se, že prezentované výsledky potvrzují naši hypotézu, že rizikové faktory aterosklerotického postižení u dětí s chronickým selháním ledvin jsou pravděpodobně jiné, než u běžné dětské populace.

Souhrn

Děti s chronickým selháním ledvin, tvoří skupinu s extrémně vysokým rizikem rozvoje předčasného onemocnění kardiovaskulárního systému. V rámci naší práce jsme prokázali, že měření tloušťky intimy medie karotických tepen (CIMT) ultrazvukem s vysokou rozlišitelností je vhodnou metodou k diagnostice aterosklerotického postižení cév v jeho preklinickém stadiu a to především u menších dětí. Naopak metoda na endotelu závislé dilatace brachiální artérie (FMD) se z našeho pohledu v pediatrii ukázala být nepříliš vhodná.

V našem souboru pacientů jsme metodou CIMT neprokázali souvislost známek preklinického aterosklerotického postižení s žádným z klasických rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění (hypertenze, dyslipidemie, BMI).

Naopak významná korelace byla ve skupině pacientů nalezena mezi poškozením cévní stěny a hodnotami sérového bilirubinu, což by dle našeho názoru mohlo ukazovat na porušenou schopnost obrany proti oxidačnímu stresu, který je považován za jeden ze zásadních faktorů v rozvoji aterosklerotického postižení. Negativní korelace hodnot sérového albuminu s CIMT může být způsobena horším stavem výživy nefrologických pacientů a upozorňuje na důležitost sledování nutričního stavu těchto dětí. Dosud se v otázce rizikových faktorů aterosklerózy u pediatrických pacientů neobjevují úvahy o možné důležitosti rozdílů mezi pohlavími, které jsou známy v dospělé populaci. Není vyloučeno, že u dětí s onemocněními, které extrémně zvyšují rizika předčasného aterosklerotického postižení hraje rozdíl v hladinách pohlavních hormonů podstatnou roli v rozvoji cévních změn, především u dívek vstupujících do menarche. Tímto směrem ukazuje náš nálezný výrazně rozdílné korelace proteinurie s CIMT mezi skupinou chlapců a dívek.

Naše výsledky tak doplňují pozorování jiných autorů, že rizikové faktory kardiovaskulárního postižení jsou ve skupině dětí s chronickým selháním ledvin jiné než u běžné populace.

V následné intervenční studii se jeden z námi zjištěných rizikových faktorů- proteinurii podařilo u dětí po transplantaci ledviny signifikantně snížit. Další vyšetření těchto pacientů neinvazivní metodou CIMT by mohlo ukázat, zda pokles tohoto rizikového parametru u nich skutečně vedl ke zmírnění progresu či dokonce regresi zjištěných aterosklerotických změn. Doufáme, že naše práce alespoň malou měrou přispěly k poznání, že rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění i terapeutické cíle u dětí s chronickým renálním selháním

nejsou pravděpodobně shodné s těmi pro běžnou populaci a že přinesly některé nové poznatky, které by mohly napomoci k přizpůsobení preventivních a léčebných opatření kardiovaskulárních onemocnění pro tuto specifickou skupinu dětských pacientů.

Summary

Children with chronic renal failure are at extremely high risk of premature cardiovascular disease. In our work, we have shown that the measurement of carotis intima-media thickness (CIMT) with high resolution ultrasound is a suitable method for the diagnosis of early atherosclerotic changes especially in younger children. In contrast, flow mediated dilatation (FMD) according to our experience is not very suitable method for investigations in pediatrics because of its high variability.

In our group of patients we did not find correlation of preclinical atherosclerosis measured by CIMT with any of the traditional cardiovascular risk factors (hypertension, dyslipidemia, overweight expressed as body mass index).

In contrast, a significant negative correlation was found in the ESRD patients between the CIMT and serum bilirubin and albumin. On the one hand, these findings could indicate an impaired defending mechanisms against oxidative stress, which are considered one of the key factors in the development of atherosclerotic process, on the other hand they indicated an important role played by nutritional status in children with ESRD.

In addition, we found strong evidence for significant correlations between CIMT and proteinuria as another discussed cardiovascular risk factor in boys, but not in girls. To our knowledge, this finding and possible gender differences already in childhood were not systematically studied so far in contrast to adult populations.

We could offer explanation of this finding as follows: In children at substantially increased risk the differences in the changing levels of sex hormones could be of importance in developing atherosclerotic changes, offering protection to girls approaching menarche.

Despite we have no direct data to support this rather speculative explanation, indirect support is coming from our previous study describing menopausal transition – similarly as menarche characterized by rapidly changing sex hormone milieu - as critical period for progression of atherosclerosis.

On the one hand our results confirmed already described observations of other authors that in children with chronic renal failure the cardiovascular risk factors are different than in the general population, on the other hand they present complementary data regarding role of the oxidative stress/nutritional status and sex differences.

In addition, the importance and manageable character of proteinuria was observed in study of antihypertensive treatment in children after renal transplantation in which proteinuria was significantly reduced. Nevertheless, further follow-up of these patients using noninvasive method of CIMT is needed to prove whether the improvement of this parameter actually leads to reduction in progression atherosclerotic changes.

In conclusion, we hope that our work highlighted uniqueness of particular risk factors in atherosclerotic disease in pediatric patients with chronic renal failure and also added information for more tailored prevention and management of cardiovascular disease in this population.

Publikace autora, které jsou podkladem disertační práce

Impaktované:

Dvořáková HM, Szitányi P, Dvořák P, Janda J, Seeman T, Zieg J, Lánská V, Kotaška K, Piřha J. Determinants of premature atherosclerosis in children with end- stage renal disease. *Physiol. Res.* 61: 53-61, 2012

Piřha J, Králová Lesná I, Poledne R, Kovář J, Lejsková M, **Dvořáková H**, Adámková S, Lánská V, Bobak M. Menopausal transition enhances the atherogenic risk of smoking in middle aged women. *Int J Cardiol.* 2012 Oct 4. pii: S0167-5273(12)01201-6. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.09.095. [Epub ahead of print]

Dvorakova HM., Pitha J., Szitanyi P., Dvorak P. Determinants of premature atherosclerosis in children with end- stage renal disease. *Atherosclerosis Supplements* 2008;9(1):180.

Seeman T, Simkova E, Kreisinger J, Vondrak K, Dusek J, Dvorak P, **Stuchlikova H**, Janda J. Reduction of proteinuria during intensified antihypertensive therapy in children after renal transplantation. *Transplant Proc* 2007;39(10):3150-2.

Bez impakt faktorů

Janda J, Vondrák K, **Dvořáková H**, Seeman T. Chronické poruchy funkce ledvin u dětí a kardiovaskulární systém dětí. *Postgrad med* 2008;10(5):60–66.

Stuchlíková H, Piřha J, Szitányi P, Janda J. Možnosti stanovení rizika rozvoje předčasné aterosklerózy zobrazovacími metodami v dětském věku. *Čes-slov Pediatr* 2005;60(5):293-297.

Publikace, které nejsou podkladem disertační práce

Impaktované:

Zieg J, Blahova K, Seeman T, Bronsky J, **Dvorakova H**, Pechova M, Janda J, Matousovic K. Urinary transforming growth factor beta 1 in children with obstructive uropathy. *Nephrology (Carlton)* 2011;16(6):595-8.

Obermannova B, Banghova K, Sumnik Z, **Dvořákova HM**, Betka J, Fencel F, Koloušková S, Cinek O, Lebl J. Unusually severe phenotype of neonatal primary hyperparathyroidism due to a heterozygous inactivating mutation in the CASR gene. *Eur J Pediatr* 2009;168(5):569-73.

Szitányi P, Pistulková H, Hubáček JA, **Stuchlíková H**, Poledne R. APOE/intrauterine undernutrition interaction and hypercholesterolemia in children. *Physiol Res* 2008;57:965-8.

Průša R, Blašík J, Kukačka J, Kizek R, **Stuchlíková H**. Plasma metallothionein levels in lead poisoned child. *Toxicol Lett* 2005;158(Suppl.1):S1-S276.

Bez impakt faktorů

Stuchlíková H, Dvořák P, Remešová S, Procházka J, Kukačka J, Průša R, Janda J, Vavřinec J. Závažná intoxikace olovem z keramické čajové konvice u desetileté dívky. *Čes-slov Pediatr* 2006;61(12):692-696.

Szitányi P, **Stuchlíková H**, Janda J. Poruchy tukového metabolismu u dětí a dorostu a možnosti jejich léčby. *Postgrad med Supplementum* 2006;8(3):50-55.

Szitányi P, **Stuchlíková H**, Piřha J, Janda J. Porodní hmotnost a riziko kardiovaskulární morbidity (Bakerova hypotéza). *Postgrad med* 2005;7(3):21-23.

Literatura

1. Adla T. Výpočetní tomografie v kardiologii: současné možnosti a využití. *Postgrad med* 2009;11(9):982-992.
2. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M. Jr, Detrano R., Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990;15(4):827-32.
3. Arbeiter K, Pichler A, Stemberger R, Mueller T, Ruffingshofer D, Vargha R, Balzar E, Aufricht C. ACE inhibition in the treatment of children after renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 2004;19(2):222-226.
4. Aschermann M, Linhart A. Ateroskleróza dětského věku- vztah patogeneze a primární prevence. *Postgrad med* 2007;9(4):399-402.
5. Attman PO, Samuelsson O, Alaupovic P. Progression of renal failure: role of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Kidney Int Suppl* 1997;63:98-101.
6. Attman PO, Samuelsson O. Dyslipidemia of kidney disease. *Curr Opin Lipidol.*, 2009;20:293–9.
7. Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995;311:171-174.
8. Basiratnia M, Fazel M, Lotfi M, Hosseini Al-Hashemi G, Fallahzadeh MH, Derakhshan A, and Salehipour M. Subclinical atherosclerosis and related risk factors in renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol* 2010;25(2):343-8.
9. Belcaro G, Geroulakos G, Laurora G, Cesarone MR, De Sanctis MT, Incandela L, Barsotti A., Inter/intra-observer variability of carotid and femoral bifurcation intima-media thickness measurements. *Panminerva Med* 1993;35(2):75-9.
10. Berenson GS. Childhood risk factors predict adult risk associated with subclinical cardiovascular disease. The Bogalusa Heart Study. *Am J Cardiol* 2002;90(10C):3L-7L.
11. Bilginer Y, Ozaltin F, Basaran C, Aki TF, Karabulut E, Duzova A, Besbas N, Topaloglu R, Ozen S, Bakkaloglu M, and Bakkaloglu A. Carotid intima-media thickness in children and young adults with renal transplant: Internal carotid artery vs. common carotid artery. *Pediatr Transplant* 2007;11(8): 888-94.
12. Brand JS, Chan MF, Dowsett M, Folkerd E, Wareham NJ, Luben RN, Van Der Schouw YT, Khaw KT. Cigarette smoking and endogenous sex hormones in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:3184-92.
13. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, and Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992;340(8828):1111-5.

14. Civilibal M, Caliskan S, Oflaz H, Sever L, Candan C, Canpolat N, Kasapcopur O, Bugra Z, and Arisoy N. Traditional and "new" cardiovascular risk markers and factors in pediatric dialysis patients. *Pediatr Nephrol* 2007;22(7):1021-9.
15. Civilibal M, Oflaz H, Caliskan S, Candan C, Canpolat N, Pehlivan G, Sever L, Kasapcopur O, and Arisoy N. Left ventricular systolic and diastolic function and carotid intima-media thickness in pediatric dialysis patients. *Int Urol Nephrol* 2009;41(2):401-8.
16. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, and Vogel R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: A report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J. Am. Coll. Cardiol* 2002;39:257-265.
17. Dafopoulos A, Dafopoulos K, Georgoulis P, Galazios G, Limberis V, Tsikouras P, Koutlaki N, Maroulis G. Smoking and AMH levels in women with normal reproductive history. *Arch Gynecol Obstet* 2010;282:215-9.
18. Delucchi A, Dinamarca H, Gainza H, Whittle C, Torrealba I, and Iniguez G. Carotid intima-media thickness as a cardiovascular risk marker in pediatric end-stage renal disease patients on dialysis and in renal transplantation. *Transplant Proc* 2008;40(9):3244-6.
19. Demircioglu F, Kocyigit A, Arslan N, Cakmakci H, Hizli S, and Sedat AT. Intima-media thickness of carotid artery and susceptibility to atherosclerosis in obese children with nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;47(1):68-75.
20. Dobiasova M, Frohlich J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)). *Clin Biochem* 2001;34(7):583-8.
21. Dvorakova HM, Szitanyi P, Dvorak P, Janda J, Seeman T, Zieg J, Lanska V, Kotaska K, Pitha J. Determinants of premature atherosclerosis in children with end-stage renal disease. *Physiol Res* 2012;61(1):53-61.
22. Fadini GP, de Kreutzenberg S, Albiero M, Coracina A, Pagnin E, Baesso I, Cignarella A, Bolego C, Plebani M, Nardelli GB, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:997-1004.
23. Fan AZ, Dwyer JH. Sex differences in the relation of HDL cholesterol to progression of carotid intima-media thickness: the Los Angeles Atherosclerosis Study. *Atherosclerosis*, 2007;195:e191-6.
24. Fellstrom BC, Jardine AG, Schmieder RE, Holdaas H, Bannister K, Beutler J, Chae DW, Chevaile A, Cobbe SM, Gronhagen-Riska C, De Lima JJ, Lins R, Mayer G, McMahon AW, Parving HH, Remuzzi G, Samuelsson O, Sonkodi S, Sci D,

- Suleymanlar G, Tsakiris D, Tesar V, Todorov V, Wiecek A, Wuthrich RP, Gottlov M, Johnsson E, Zannad F and Aurora study group. Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2009;360(14):1395-407.
25. Gansevoort RT, Sluiter WJ, Hemmelder MH, et al. Antiproteinuric effect of blood pressure lowering agents: a meta analysis of comparative trials. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:1963-1974.
 26. Groothoff JW, Lilien MR, van de Kar NC, Wolff ED, and Davin JC. Cardiovascular disease as a late complication of end-stage renal disease in children., *Pediatr Nephrol*, 2005;20(3):374-9.
 27. Grundtvig M, Hagen TP, German M, Reikvam A. Sex-based differences in premature first myocardial infarction caused by smoking: twice as many years lost by women as by men. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009;16:174-9.
 28. Haydar AA, Hujairi NMA, Covic AA, Pereira D, Rubens M, Goldsmith DJA., Coronary artery calcification is related to coronary atherosclerosis in chronic renal disease patients: a study comparing EBCT-generated coronary artery calcium scores and coronary angiography. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:2307-2312.
 29. Huxley RR, Woodward M. Cigarette smoking as a risk factor for coronary heart disease in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Lancet* 2011;378:1297-305.
 30. Jansen T, Hortmann M, Oelze M, Opitz B, Steven S, Schell R, Knorr M, Karbach S, Schuhmacher S, Wenzel P, Munzel T, and Daiber A. Conversion of biliverdin to bilirubin by biliverdin reductase contributes to endothelial cell protection by heme oxygenase-1-evidence for direct and indirect antioxidant actions of bilirubin. *J Mol Cell Cardiol* 2010;49(2):186-95.
 31. Järvisalo MJ, Rönnemaa T, Volaném I, Kaitosaari T, Kalilo K, Hartiala JJ, Irjala K, Viikari JSA, Simell O, and Raitakari OT. Brachial artery dilatation responses in healthy children and adolescents, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H87 - H92.
 32. Järvisalo MJ, Lehtimäki T, and Raitakari OT. Determinants of Arterial Nitrate-Mediated Dilatation in Children: Role of Oxidized Low-Density Lipoprotein, Endothelial Function, and Carotid Intima-Media Thickness. *Circulation* 2004;109:2885 - 2889.
 33. Jehlicka P, Stozicky F, Mayer JR, Varvarovska J, Racek J, Trefil L, Siala K. Asymmetric dimethylarginine and the effect of folate substitution in children with familial hypercholesterolemia and diabetes mellitus type 1. *Physiol Res* 2009;58(2):179-84.
 34. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thürlitz C, and Lüscher TF., Nitric Oxide Is Responsible for Flow-Dependent Dilatation of Human Peripheral Conduit Arteries In Vivo. *Circulation* 1995;91:1314 - 1319.

35. Johnson HM, Douglas PS, Srinivasan SR, Bond MG, Tang R, Li S, Chen W, Berenson GS, and Stein JH. Predictors of Carotid Intima-Media Thickness Progression in Young Adults: The Bogalusa Heart Study. *Stroke* 2007;38:900 - 905.
36. Jourdan C, Wuhl E, Litin M, Fahr K, Trelewicz J, Jobs K, Schenk JP, Grenda R, Mehls O, Troger J, and Schaefer J. Normative values for intima-media thickness and distensibility of large arteries in healthy adolescents. *J Hypertens* 2005;23(9):1707-15.
37. Kavey RW, Allada V, Daniels SR, Hayman LL, McCrindle BW, Newburger JW, Parekh RS, and Steinberger J. Cardiovascular Risk Reduction in High-Risk Pediatric Patients: A Scientific Statement From the American Heart Association Expert Panel on Population and Prevention Science; the Councils on Cardiovascular Disease in the Young, Epidemiology and Prevention, Nutrition, Physical Activity and Metabolism, High Blood Pressure Research, Cardiovascular Nursing, and the Kidney in Heart Disease; and the Interdisciplinary Working Group on Quality of Care and Outcomes Research: Endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* 2006;114:2710 - 2738.
38. Kaysen GA. Lipid and lipoprotein metabolism in chronic kidney disease. *J Ren Nutr.* 2009;19:73–7.
39. Keith DS, Nichols GA, Gullion 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* 2004;164(6):659-63.
40. Koller A and Kaley G. Endothelial regulation of wall shear stress and blood flow in skeletal muscle microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1991;260:H862 - H868.
41. Kralova Lesna I, Suchanek P, Kovar J, Stavek P, Poledne R. Replacement of dietary Saturated FAs by PUFAs in diet and reverse cholesterol transport. *J LipidRes* 2008;49:2414-8.
42. Kronenberg F, Dieplinger H, Konig P, Utermann G. Lipoprotein metabolism in renal replacement therapy : a review. *Isr J Med Sci* 1996;32(6):371-389.
43. Kwan BC, Kronenberg F, Beddhu S, Cheung AK. Lipoprotein metabolism and lipid management in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:1246–61.
44. Leeson P, Thorne S, Donald A, Kuklen M, Clarkson P, and Deanfield J. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart* 1997;78:22 - 27.
45. Leeson CPM, Whincup PH, Cook DG, Donald AE, Papacosta O, Lucas A, and Deanfield JE. Flow-Mediated Dilatation in 9- to 11-Year-Old Children : The Influence of Intrauterine and Childhood Factors. *Circulation* 1997;96:2233 - 2238.

46. Lilien MR, Stroes ES, Op't Roodt J, De Jongh S, Schroder CH, and Koomans HA. Vascular function in children after renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 2003;41(3):684-91.
47. Litwin M, Wühl E, Jourdan C, Trelewicz J, Niemirska A, Fahr K, Jobs K, Grenda R, Šašer ZT, Rajszyz P, Tröger J, Mehls O, and Schaefer F. Altered Morphologic Properties of Large Arteries in Children with Chronic Renal Failure and after Renal Transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005;16:1494-1500.
48. Marek J. Žena a hormony očima endokrinologa. *Postgrad med Supplementum* 2011;13(3):51-55.
49. Mesquita J, Varela A, Medina JL. Dyslipidemia in renal disease: causes, consequences and treatment. *Endocrinol Nutr* 2010;57(9):440-8.
50. McDonald SP, Craig JC, the Australian and New Zealand Paediatric Nephrology Association. Long-Term Survival of Children with End-Stage Renal Disease. *N Engl J Med* 2004;350:2654–2662.
51. Mitsnefes MM, Kimball TR, Witt SA, Glascock BJ, Kňoury PR, and Daniels SR. Abnormal Carotid Artery Structure and Function in Children and Adolescents With Successful Renal Transplantation. *Circulation* 2004;110:97-101.
52. Mitsnefes MM. Cardiovascular complications of pediatric chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2008;23(1):27-39.
53. Mráz M, Spurný P, Pytliak M, Podracká L. Endotelová dysfunkcia. *Čes-slov Pediat* 2004;59(6):311-315.
54. Multinational monitoring of trends and determinants in cardiovascular diseases: “MONICAProject”. *Manual of operations WHO/MNC 82.2:1983.*
55. Munir JA, Wu H, Bauer K, Bindeman J, Byrd C, Feuerstein IM, Villines TC, Taylor AJ. The perimenopausal atherosclerosis transition: relationships between calcified and noncalcified coronary, aortic, and carotid atherosclerosis and risk factors and hormone levels. *Menopause* 2012;19:10-5.
56. Napoli C, D'ArmientoDagger FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbopar G, and Palinski W. Fatty Streak Formation Occurs in Human Fetal Aortas and is Greatly Enhanced by Maternal Hypercholesterolemia. Intimal Accumulation of Low Density Lipoprotein and its Oxidation Precede Monocyte Recruitment into Early Atherosclerotic Lesions. *J. Clin. Invest.* 1997; 11:2680-2690.
57. Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D'Armiento FP, and Palinski W., Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study., *Lancet* 1999;354(9186):1234-41.

58. Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1994;269: 16712–16719.
59. Nurmohamed SA, Nube MJ. Reverse epidemiology: paradoxical observations in hemodialysis patients. *Neth J Med* 2005;63(10):376-81.
60. Oh J, Wunsch R, Turner M, Bahner M, Maggi P, Querfeld U, Mehls O, and Schaefer F. Advanced Coronary and Carotid Arteriopathy in Young Adults With Childhood-Onset Chronic Renal Failure. *Circulation* 2002;106:100 - 105.
61. Oren A, Vos LE, Uiterwaal CS, Bak AA, Gorissen WH, Grobbee DE, Bots ML. The atherosclerosis risk in young adults (ARYA) study: rationale and design. *Eur J Epidemiol* 2003;18(7):715-27.
62. Palinski W, Napoli C. The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. *The FASEB Journal*. 2002;16:1348-1360.
63. Parekh RS, Carroll CE, Wolfe RA, and Port FK. Cardiovascular mortality in children and young adults with end-stage kidney disease. *J Pediatr* 2002;141(2):191-7.
64. Persson J, Formgren J, Israelsson B, and Berglund G. Ultrasound-determined intima-media thickness and atherosclerosis. Direct and indirect validation., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:261 - 264.
65. Piecha G, Adamczak M, Ritz E. Dyslipidemia in chronic kidney disease: pathogenesis and intervention. *Pol Arch Med Wewn* 2009;119(7-8):487-92.
66. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, and Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986;74:1399-1406.
67. Pitřha J, Roztočil K, Cífková R, Lánská V. Endoteliální dysfunkce a její hodnocení. *Cor Vasa* 2001;43(9):452-456.
68. Pitha J, Krajickova D, Cifkova R, Hubacek J, Petrzilkova Z, Hejl Z, Stavek P, Skibova J, Poledne R. Intima-media thickness of carotid arteries in borderline hypertensives. *J Neuroimaging* 1999;9(1):19-22.
69. Plante BJ, Cooper GS, Baird DD, Steiner AZ. The impact of smoking on antimüllerian Hormone levels in women aged 38 to 50 years. *Menopause* 2010;17:571-6.
70. Poyrazoglu HM, Dusunsel R, Yikilmaz A, Narin N, Anarat R, Gunduz Z, Voskuj A, Baykan A, and Ozturk A. Carotid artery thickness in children and young adults with end stage renal disease., *Pediatr Nephrol* 2007;22(1):109-16.
71. Quaschnig T, Krane V, Metzger T, Wanner C. Abnormalities in uremic lipoprotein metabolism and its impact on cardiovascular disease. *Am J Kidney*

- 2001:38(4Suppl.1):14–9.
72. Querfeld U. Is atherosclerosis accelerated in young patients with end-stage renal disease? The contribution of paediatric nephrology. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:719-722.
 73. Querfeld U. Disturbances of lipid metabolism in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* 1993;7(6):749-57.
 74. Raitakari OT. Imaging of subclinical atherosclerosis in children and young adults. *Ann Med*, Apr 1999;31(Suppl1):33-40.
 75. Reichel H, Zeier M, Ritz E. Proteinuria after renal transplantation: pathogenesis and management. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:301-305.
 76. Ritz E. Why are lipids not predictive of cardiovascular death in the dialysis patient?, *Miner Electrolyte Metab* 1996;22(1-3):9-12.
 77. Ritz E, Wanner C. Lipid abnormalities and cardiovascular risk in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:1065-70.
 78. Rodriguez RR, Gómez-Díaz RA, Haj JT, Garnica FJA, Soriano ER, Meguro EN, Aguilar-Salinas CA and Wachter NH. Carotid Intima-Media Thickness in Paediatric Type 1 Diabetic Patients. *Diabetes Care* 2007;30:2599–2602.
 79. Roodnat JJ, Mulder PG, Rischen-Vos J, Van Riemsdijk IC, Van Gelder T, Zietse R, Ijzermans JN, Weimar W. Proteinuria after renal transplantation affects not only graft survival but also patient survival. *Transplantation* 2001;72(3):438-44.
 80. Saland JM, Pierce CB, Mitsnefes MM, Flynn JT, Goebel J, Kupferman JC, Warady BA, Furth SL, and CKiD Investigators. Dyslipidemia in children with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2010; 78(11):1154-63.
 81. Saland JM, Ginsberg HN. Lipoprotein metabolism in chronic renal insufficiency. *Pediatr Nephrol* 2007;22:1095–112.
 82. Salonen R, Haapanen A, Salonen JT. Measurement of intima-media thickness of common carotid arteries with high-resolution B-mode ultrasonography: inter- and intra-observer variability. *Ultrasound Med Biol* 1991;17(3):225-30.
 83. Šamánek M, Urbanová Z. *Prevenence aterosklerózy v dětském věku*, 2003, nakladatelství Galén Praha.
 84. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Cullerton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, and Wilson PW. Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease: A Statement From the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Hypertension* 2003;42:1050-1065.

85. Sarnak MJ. and Astor BC. Implications of proteinuria: CKD progression and cardiovascular outcomes. *Adv Chronic Kidney Dis* 2011;18(4):258-66.
86. Sass C, Herbeth B, Chapet O, Siest G, Visvikis S, and Zannad F. Intima-media thickness and diameter of carotid and femoral arteries in children, adolescents and adults from the Stanislas cohort: effect of age, sex, anthropometry and blood pressure., *J Hypertens* 1998;16(11):1593-602.
87. Schmidt C, Wendelhag I. How can the variability in ultrasound measurement of intima-media thickness be reduced? Studies of interobserver variability in carotid and femoral arteries. *Clin Physiol* 1999;19(1):45-55.
88. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM Jr, Spitzer A. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics* 1976;58(2):259-63.
89. Sedlak TW, Snyder SH. Bilirubin Benefits: Cellular Protection by a Biliverdin Reductase Antioxidant Cycle. *Pediatrics* 2004;113(6):1776-1782.
90. Seeman T, Dusek J, Vondra K, Simkova E, Kreisinger J, Feber J, and Janda J. Ambulatory blood pressure monitoring in children after renal transplantation. *Transplant Proc* 2004;36(5):1355-6.
91. Seeman T, Šimková E, Kreisinger J, Vondrak K, Dusek J, Dvorak P, Janda J. Proteinuria in children after renal transplantation. *Transplant Proc* 2005;37:4282-3.
92. Seeman T, Simkova E, Kreisinger J, Vondrak K, Dusek J, Dvorak P, Stuchlikova H, Janda J. Reduction of proteinuria during intensified antihypertensive therapy in children after renal transplantation. *Transplant Proc* 2007;39(10):3150-2.
93. Shewan LG, Coats AJ. Principles of ethical publishing in the *International Journal of Cardiology*: ethics in the authorship and publishing of scientific articles. *IntJ Cardiol* 2010;144:1.
94. Soergel M, Kirschstein M, Busch C, Danne T, Gellermann J, Holl R, Krull F, Reichert H, Reusz GS, Rascher W. Oscillometric twenty-four-hour ambulatory blood pressure values in healthy children and adolescents: a multicenter trial including 1141 subjects. *J Pediatr* 1997;130(2):178-84.
95. Soules MR, Sherman S, Parrott E. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Climacteric* 2001;4:267-72.
96. Stary HC, Blankenhorn DH, Chander AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwarz CJ and Wagner WD. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1992;85:391-405.
97. Stary HC, Chander AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwarz CJ, Wagner WD and Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and

- intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:840-856.
98. Stary HC, Chair MD; Bleakley Chander A, Dinsmore RE, Futer V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwarz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1512-1531.
 99. Stary HC. Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions An Update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1177-1178.
 100. Stary HC. Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis. *Am J Clin Nutr* 2000;72(5):1297S-1305S.
 101. Strong JP, McMahan CA, Oalman MC, Malcom, GT. Natural history of aortic and coronary atherosclerotic lesions in youth. Findings from the PDAY Study. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993;13(9):1291-1298.
 102. Stuchlíková H, Piřha J, Szitányi P, Janda J. Možnosti stanovení rizika rozvoje předčasné aterosklerózy zobrazovacími metodami v dětském věku. *Čes-slov Pediat* 2005;60(5):293-297.
 103. Szitanyi P, Janda J, Poledne R. Intrauterine undernutrition and Programming as a New Risk of Cardiovascular Disease in Later Life. *Physiol Res* 2003;52:389-395.
 104. Szitányi P, Pistulková H, Hubáček JA, Stuchlíková H, Poledne R. APOE/intrauterine undernutrition interaction and hypercholesterolemia in children. *Physiol Res* 2008;57:965-8.
 105. Tamura H, Suzue T, Jitsunari F, and Hirao T; Evaluation of carotid arterial intima-media thickness (IMT) and its relation to clinical parameters in Japanese children., *Acta Med Okayama* 2011;65(1):21-5.
 106. Tokgözoğlu L, Yorgun H, Gürses KM, Canpolat U, Ates AH, Tulumen E, Kaya EB, Aytemir K, Kabakci G, Tuncer M, Oto A. The association between circulating endothelial progenitor cells and coronary collateral formation. *Atherosclerosis* 2011;219(2):851-4.
 107. Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M, McAlister F, Garg AX. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2034-2047.
 108. Traindl O, Falger S, Reading S, Banyai M, Liebisch B, Gisinger J, Templ E., Mayer G, Kovarik J. The effects of lisinopril on renal function in proteinuric renal transplant recipients. *Transplantation* 1993;55:1309-13.

109. Toussaint JF, LaMuraglia GM, Southern JF, Fuster V, Kantor HL. Magnetic resonance images lipid, fibrous, calcified, hemorrhagic, and thrombotic components of human atherosclerosis in vivo. *Circulation* 1996;94:932-8.
110. Tunstall-Pedoe H. Monitoring trends in cardiovascular disease and risk factors: the WHO "Monica" project. *WHO Chron* 1985;39:3-5.
111. Urbanova Z, Samanek M, Ceska R, Cifkova R, Poledne R, Rosolova H, Soska V, Simon J, Vaverkova H, Widimsky J JR, Widimsky J SR, Zadak Z. Recommendations for the diagnosis and therapy of hyperlipoproteinemia in childhood and adolescence developed by the Committee of the Czech Society for Atherosclerosis. *Cas Lek Cesk* 1998;137:89-92.
112. Van der Schouw YT, Van der Graaf Y, Steyerberg EW, Eijkemans JC, Banga JD. Age at menopause as a risk factor for cardiovascular mortality. *Lancet*, 1996, 347, p. 714–718.
113. Vaziri ND. Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol* 2004;24(5):469-73.
114. Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, and Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int* 2003;63(1):179-85.
115. Vercoza AM, Baldisserotto M, de Los Santos CA, Poli-de-Figueiredo CE, and d'Avila DO., Cardiovascular risk factors and carotid intima-media thickness in asymptomatic children., *Pediatr Cardiol* 2009;30(8):1055-60.
116. Vos LE, Oren A, Uiterwaal C, Gorisser WH, Grobbee DE and Bots ML. Adolescent blood pressure and blood pressure tracking into young adulthood are related to subclinical atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Young Adults (ARYA) study. *Am J Hypertens* 2003;16(7):549-55.
117. Wanner C, Quaschnig T. Dyslipidemia and renal disease: pathogenesis and clinical consequences. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:195–201.
118. Wendelhag I, Gustavsson T, Suurkula M, Berglund G, and Wikstrand J. Ultrasound measurement of wall thickness in the carotid artery: fundamental principles and description of a computerized analysing system. *Clin Physiol* 1991;11(6):565-77.
119. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, and Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1149-1160.
120. Wiegman A, De Groot E, Hutten BA, Rodenburg J, Gort J, Bakker HD, Sirjbrans EJG, Kastelein JJ. Arterial intima-media thickness in children heterozygous for familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 2004;363:369-70.
121. Wild RA. Atherosclerotic burden during the menopausal transition is a wake up call., *Menopause* 2012;19:1-2.

122. Wilson AC, Mitsnefes MM. Cardiovascular disease in CKD in children: update on risk factors, risk assessment, and management. *Am J Kidney Dis* 2009;54(2):345-60.
123. Wilson AC, Urbina E, Witt SA, Glascock BJ, Kimball TR, and Mitsnefes M. Flow-mediated vasodilatation of the brachial artery in children with chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2008; 23(8):1297-302.
124. Wingen AM, Fabian-Bach C, Schaefer F, Mehls O. Randomized multicentre study of a low-protein diet on the progression of chronic renal failure in children. European Study Group of Nutritional Treatment of Chronic Renal Failure in Childhood. *Lancet* 1997;349:1117-23.
125. Wong M, Edelstein J, Wollman J, and Bond MG. Ultrasonic-pathological comparison of the human arterial wall. Verification of intima-media thickness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993;13:482-486.
126. Yang XZ, Liu Y, Mi J, Tang CS, DU JB. Pre-clinical atherosclerosis evaluated by carotid artery intima-media thickness and the risk factors in children. *Chin Med J (Engl)* 2007;120(5):359-62.