

Calcificazioni cardiovascolari e aterosclerosi accelerata in corso di uremia

Mario Cozzolino, Alessandra Butti, Giusy Chiarelli, Lisa Rocca-Rey, Gaia Santagostino, Maurizio Gallieni, Diego Brancaccio

U.O. di Nefrologia e Dialisi, A.O. San Paolo, Polo Universitario, Milano

Key words:
Calcification; Calcium;
Kidney; Phosphates.

Cardiovascular disease is the first cause of morbidity and mortality in dialysis patients. Hyperphosphatemia and elevated serum calcium-phosphate levels have recently been investigated as inducing factors on extraskeletal calcification in this population. *In vitro* studies demonstrated that human aortic smooth muscle cells calcify when incubated in a high phosphate medium, where calcium and calcitriol are not changed. Furthermore, the lack of inhibitory proteins, such as fetuin and matrix Gla protein, is a possible main determinant of calcium-phosphate deposition in soft tissues. The classical treatment of hyperphosphatemia and secondary hyperparathyroidism in dialysis patients consists of calcium-based phosphate binders and calcitriol administration. Unfortunately, this "first-generation" therapy is not free of dramatic side effects. New free-calcium and -aluminum phosphate binders, new vitamin D metabolites, and calcimimetics are examples of "second-generation" therapies that may prevent vascular calcification and possibly prevent some of the burden of cardiovascular disease in uremia.

(Ital Heart J Suppl 2005; 6 (1): 25-28)

© 2005 CEPI Srl

Ricevuto il 27 ottobre 2004; nuova stesura il 3 gennaio 2005; accettato il 5 gennaio 2005.

Per la corrispondenza:

Dr. Mario Cozzolino

U.O. di Nefrologia
e Dialisi
A.O. San Paolo
Polo Universitario
Via A. di Rudini, 8
20142 Milano
E-mail: mariocozzolino@
hotmail.com

Introduzione

Nel corso dell'ultima decade abbiamo osservato come le alterazioni del metabolismo minerale osseo nei soggetti affetti da insufficienza renale cronica siano associate ad aumentata morbilità e mortalità per cause cardiovascolari^{1,2}. Infatti, gli eventi cardiovascolari rappresentano la causa di morte più frequente in questa popolazione^{3,4}. Tra i fattori di rischio per malattia cardiovascolare nei pazienti con insufficienza renale cronica vi sono fattori classici, tra i quali l'età anagrafica, l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito, le dislipidemie, l'obesità, l'abitudine al fumo di sigaretta, il sesso maschile e la storia familiare. A questi è doveroso affiancare i fattori di rischio per patologia cardiovascolare tipici dell'uremia: l'età dialitica, l'anemia, l'iperomocisteinemia, la disfunzione endoteliale e l'infiammazione cronica (Tab. I). Inoltre, l'alterazione dell'asse calcio-fosfato-paratormone rappresenta una delle peculiarità del soggetto con insufficienza renale cronica, che contribuisce in maniera importante alla patogenesi delle calcificazioni cardiovascolari^{5,6}. Tuttavia, questo processo di calcificazione extrascheletrica sembra avere una doppia eziopatogenesi. Infatti, "passivamente" il calcio e il fosfato possono precipitare in sede ectopica, ma è altresì vero che in questo

processo sono "attivamente" coinvolte proteine osteogeniche⁷. Da qui nasce il termine di "ossificazione" vascolare.

Fisiologicamente, il fosfato di calcio (idrossiapatite) si forma in vescicole che si legano ai condrociti nel tessuto osseo in via di formazione. In maniera simile, il fosfato di calcio può formare vescicole che si legano alle pareti arteriose dei pazienti con insufficienza renale cronica. Infatti con il deteriorarsi della funzione renale, la ridotta escrezione urinaria di fosfato e il deficit di calcitriolo causano iperfosforemia e iperparatiroidismo secondario⁸. Queste alterazioni biochimiche provocano un'alterazione del metabolismo osseo, con rischio aumentato di sviluppare osteodistrofia renale e calcificazioni extrascheletriche. Pertanto, le calcificazioni extrascheletriche sono il risultato di una precipitazione di calcio fosfato al di fuori del tessuto osseo (ectopiche), che si verificano quando i livelli sierici di prodotto calcio-fosfato superano la saturazione, ovvero sono $> 60 \text{ mg}^2/\text{dl}^2$.

Pertanto, dato che nei soggetti con insufficienza renale cronica le calcificazioni vascolari sono predittive di elevata mortalità per causa cardiovascolare e che l'iperfosfatemia e l'iperparatiroidismo secondario giocano un ruolo importante nella patogenesi delle calcificazioni ectopiche, diventa essenziale il controllo dei livelli pla-

Tabella I. Fattori di rischio cardiovascolari in corso di insufficienza renale cronica.

Fattori "classici"	Fattori "tipici"
Età anagrafica	Età dialitica
Sesso maschile	Anemia
Iperensione arteriosa	Iperomocisteinemia
Diabete mellito	Infiammazione cronica
Fumo di sigaretta	Disfunzione endoteliale
Dislipidemia	Iperfosforemia e aumentato prodotto calcio-fosfato
Obesità	Iperparatiroidismo secondario
Storia familiare	

smatici di fosfato e di paratormone, al fine di prevenire drammatiche complicanze per questa popolazione.

Calcificazione versus ossificazione vascolare

Il processo di calcificazione vascolare è definito come una deposizione di calcio e fosfato all'interno della tonaca vascolare media, attivamente regolata da geni solitamente associati all'attività di cellule osteoblastiche⁹. Diverse proteine possono essere coinvolte nell'inibizione e/o formazione di calcificazioni vascolari. È pertanto possibile ipotizzare un vero e proprio laboratorio "ossificante" all'interno dei vasi, finemente controllato da particolari geni¹⁰. Infatti, osteocalcina, osteonectina, "bone morphogenetic protein 2A" e fosfatasi alcalina sembrerebbero indurre direttamente la formazione di calcificazioni extrascheletriche. Al contrario, altre proteine come "matrix Gla protein" (MGP), fetuina, osteoprotegerina e osteopontina sembrerebbero agire come agenti "protettori", in grado di ridurre e forse di prevenire le calcificazioni vascolari. In particolare, è interessante analizzare la funzione di MGP e fetuina nel processo di calcificazione extrascheletrica.

Matrix Gla protein. Durante i primi 2 mesi di vita, i topi geneticamente modificati per MGP, ovvero che non esprimono la proteina (knock-out), sviluppano grave osteoporosi, con fratture patologiche e calcificazioni vascolari diffuse, fino alla rottura di tratti di aorta¹¹. MGP è una proteina di matrice cellulare ad affinità elevata per l'idrossiapatite, necessaria per indurre il normale sviluppo scheletrico e quindi per inibire le calcificazioni vascolari¹². In uno studio molto recente, eseguito in una popolazione di soggetti con patologia cardiovascolare e funzione renale normale, è stata dimostrata un'associazione tra livelli sierici ridotti di MGP e aumento dello score di calcificazione coronarica¹³. Questi dati indicano che MGP è necessaria sia nella formazione di tessuto osseo normale sia nell'inibizione di calcificazione vascolare, ma il suo ruolo in corso di uremia non è stato ancora identificato.

Fetuina. In studi condotti *in vitro*, la fetuina inibisce la formazione e la deposizione *de novo* di calcio-fosfato,

senza alcun effetto sui cristalli di idrossiapatite già formati¹⁴. Il deficit di fetuina nel topo "knock-out" provoca estese calcificazioni miocardiche, renali, polmonari, cutanee e linguali¹⁵. Recentemente, Ketteler et al.¹⁶ hanno evidenziato come livelli ridotti di fetuina siano correlati con un rischio più elevato di mortalità per causa cardiovascolare in una popolazione di pazienti in trattamento emodialitico. Pertanto, la fetuina sembra avere un ruolo essenziale nel prevenire il processo di calcificazione ectopica tipico dell'uremia.

Ruolo diretto del fosfato nel processo di calcificazione vascolare

Recentemente, studi *in vitro* condotti dal gruppo di Giachelli^{17,18} hanno dimostrato che concentrazioni elevate di fosfato determinano calcificazioni diffuse di cellule muscolari lisce della tonaca vascolare media di aorta umana, attraverso l'attivazione di un fattore di trascrizione che regola l'attività degli osteoblasti (core binding factor alpha-1, Cbfa-1). In particolare, Cbfa-1 è regolatore dell'espressione di diverse proteine osteogeniche come l'osteocalcina, l'osteopontina e l'osteoprotegerina¹⁹, ed è pertanto considerato uno dei geni principali della funzione osteoblastica, coinvolto in questo caso anche nei processi di calcificazione vascolare indotti dal fosfato.

Parallelamente, studi *in vivo* di Kuro-o et al.²⁰, in un modello di topo "knock-out" per il gene Klotho, hanno dimostrato come l'incremento della fosforemia, in presenza di funzione renale normale, causa contemporaneamente lo sviluppo di calcificazioni vascolari e osteoporosi. Questi dati sperimentali suggeriscono che il fosfato può direttamente regolare il processo di calcificazione, indipendente da variazioni dei livelli di calcio e vitamina D.

Controllo della fosforemia e prevenzione di calcificazioni extrascheletriche

La deposizione di calcio-fosfato non è un fenomeno esclusivamente a carico della tonaca media arteriosa, ma può manifestarsi potenzialmente in tutti i tessuti molli, anche nel contesto del parenchima renale (nephrocalcinosi), peggiorandone la vascularizzazione e accelerando la progressione dell'insufficienza renale^{21,22}. Recentemente è stato dimostrato come sevelamer cloridrato, un nuovo chelante del fosfato non contenente né calcio né alluminio, possa ridurre la fosforemia, l'ormone paratiroideo e l'iperplasia paratiroidea, senza aumentare il prodotto calcio-fosfato e di conseguenza il rischio di calcificazioni vascolari. Nei ratti trattati con sevelamer, inoltre, la funzione renale è risultata preservata grazie a una ridotta deposizione di calcio sia glomerulare che tubulo-interstiziale^{23,24}. A parità di fosforemia, ormone paratiroideo e prodotto calcio-fosfato,

in ratti uremici trattati per 3 o 6 mesi con sevelamer si è osservata una riduzione delle calcificazioni renali, aortiche e miocardiche rispetto agli animali trattati con calcio carbonato^{25,26}. In questo modello di insufficienza renale cronica, il sevelamer cloridrato controlla adeguatamente la fosforemia e l'iperparatiroidismo secondario tanto quanto i sali di calcio, ma previene il processo di calcificazione extrascheletrica.

È stato anche dimostrato che la ritenzione di fosfato conseguente all'insufficienza renale cronica non solo è causa principale di iperparatiroidismo secondario ma anche di peggioramento della funzione renale stessa attraverso l'aumento di calcificazioni renali²¹. Inoltre, Gimenez et al.²² hanno osservato, in oltre 200 pazienti sottoposti ad agobiopsia renale, un'associazione tra iperfosforemia, aumento dei depositi di calcio a livello renale e progressione dell'insufficienza renale. Più in dettaglio, i pazienti con livelli sierici di prodotto calcio-fosfato elevati e depositi tubulo-interstiziali di calcio avevano livelli plasmatici di creatinina > 1.5 mg/dl²².

Sono stati condotti alcuni studi al fine di meglio interpretare l'associazione tra insufficienza renale cronica, iperfosforemia e calcificazioni cardiovascolari. Ci sono evidenze, come descritto in un recente studio di Hsu²⁷, che suggeriscono come i pazienti in emodialisi siano sottoposti a un sovraccarico di calcio, e che l'eccesso di calcio vada a depositarsi nei tessuti extrascheletrici. Inoltre, la deposizione di calcio in eccesso a livello dei tessuti molli viene amplificata dal quadro di infiammazione cronica tipico nei soggetti uremici²⁸. Per anni si è ritenuto che nei pazienti dializzati il trattamento dell'iperfosforemia con chelanti del fosfato contenenti calcio fosse l'approccio ottimale. Ma già nel 1980, Walser²⁹ descriveva l'associazione tra somministrazione di sali di calcio in pazienti uremici e aumento della concentrazione plasmatica di creatinina, dopo solo 15-30 giorni di trattamento.

Nuovi farmaci chelanti del fosfato

I problemi legati all'uso di chelanti del fosfato che contengono calcio, alluminio o magnesio hanno stimolato la ricerca di composti alternativi che possano legare il fosfato nell'intestino senza determinare assorbimento di un catione potenzialmente tossico. Uno di questi composti è il polimero non assorbibile sevelamer cloridrato, che non contiene né calcio né alluminio. Gli studi fino ad oggi eseguiti con sevelamer cloridrato nei pazienti emodializzati hanno dimostrato l'efficacia della molecola nel ridurre la fosfatemia senza provocare innalzamenti della calcemia totale^{30,31}. Sevelamer cloridrato, in quanto polimero privo di calcio, consente di controllare la fosfatemia senza comportare ipercalcemia; diversamente la riduzione dell'iperfosfatemia ottenuta con chelanti a base di calcio dovrebbe essere condizionata dall'effetto collaterale indotto da un bilancio calcio positivo e da una maggiore incidenza di

ipercalcemia, calcificazioni vascolari ed extrascheletriche³². In uno studio recente di Chertow et al.³³ è stato inoltre dimostrato come sevelamer possa rallentare la drammatica progressione delle calcificazioni aortiche e coronariche in pazienti in emodialisi, rispetto ai pazienti che ricevevano chelanti del fosforo a base di calcio, nei quali il contenuto di calcio aortico e coronarico (misurato con la tomografia computerizzata a fascio di elettroni) aumentava rispettivamente del 28 e 25%.

Conclusioni

Le calcificazioni vascolari sono un problema grave ed emergente nei pazienti con insufficienza renale cronica. È stato recentemente ben documentato come l'aumento dei livelli plasmatici di fosfato, prodotto calcio-fosfato e ormone paratiroideo sia associato a rischio aumentato di calcificazioni cardiovascolari e di conseguente mortalità nei pazienti uremici. Un rigoroso controllo dei livelli di fosfato può prevenire le calcificazioni ectopiche attraverso la riduzione del prodotto calcio-fosfato e l'inibizione dei processi di calcificazione "attiva", regolata dalle proteine osteogeniche. I nuovi chelanti del fosfato non contenenti né calcio né alluminio sono utilizzati per il controllo della fosforemia e si sono dimostrati potenzialmente utili nella prevenzione delle calcificazioni extrascheletriche, ma ulteriori studi sono necessari per meglio comprendere i fini meccanismi patogenetici alla base di questa drammatica complicità dell'uremia.

Riassunto

La patologia cardiovascolare è la prima causa di morbilità e mortalità nei pazienti in trattamento dialitico. In questa popolazione, l'aumento dei livelli plasmatici di fosfato e di prodotto calcio-fosfato rappresenta uno dei fattori responsabili di calcificazione ectopica e di patologia cardiovascolare. Recentemente è stato documentato come i processi di calcificazione vascolare siano attivamente regolati da geni fisiologicamente coinvolti nel metabolismo osseo. La conoscenza di fattori inducenti e/o inibenti le calcificazioni extrascheletriche è pertanto di fondamentale importanza al fine di prevenire elementi di comorbilità che possono portare a complicanze drammatiche nel soggetto uremico. Studi recenti *in vitro* hanno dimostrato che cellule vascolari muscolari lisce di aorta umana calcificano se incubate in un terreno di coltura contenente concentrazioni elevate di fosfato. Il trattamento "classico" dell'iperfosforemia e dell'iperparatiroidismo secondario in corso di uremia consiste nella somministrazione di chelanti del fosfato a base di alluminio e/o calcio e di calcitriolo, dei quali sono ben noti gli effetti collaterali. I nuovi chelanti del fosfato non contenenti né calcio né alluminio, i nuovi analo-

ghi della vitamina D e gli agenti calcio-mimetici permettono un trattamento più adeguato di questi pazienti e sono efficaci nel prevenire le calcificazioni vascolari. In conclusione, le calcificazioni ectopiche in corso di uremia sembrano dipendere da un processo metabolico molto complesso. L'identificazione dei meccanismi patogenetici alla base dei processi di calcificazione extrascheletrica può permettere lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche al fine di ridurre questa drammatica complicanza dell'uremia e può anche gettare le basi per una migliore comprensione della vasculopatia del soggetto non uremico.

Parole chiave: Calcificazioni; Calcio; Fosfato; Rene.

Bibliografia

1. Ganesh SK, Stack AG, Levin NW, Hulbert-Shearon T, Port FK. Association of elevated serum PO_4 , $Ca \times PO_4$ product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2131-8.
2. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium \times phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis* 1998; 31: 607-17.
3. European Transplantation and Dialysis Association. Report on management of renal failure in Europe, XXIV, 1993. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10 (Suppl 5): 12.
4. US Renal Data System: causes of death. Annual data report. Bethesda, MD: National Institute of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 1995; 14: 79-90.
5. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, et al. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 2000; 342: 1478-83.
6. London GM, Pannier B, Marchais SJ, Guerin AP. Calcification of the aortic valve in the dialyzed patient. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 778-83.
7. Jakoby MG 4th, Semenkovich CF. The role of osteoprogenitors in vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9: 11-5.
8. Cozzolino M, Dusso A, Slatopolsky E. Role of calcium \times phosphate product and bone associated proteins on vascular calcification in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2511-6.
9. Christian RC, Fitzpatrick LA. Vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; 8: 443-8.
10. Cozzolino M, Brancaccio D, Gallieni M, Slatopolsky E. Pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005, in press.
11. Luo G, Ducy P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; 386: 78-81.
12. Shearer MJ. Role of vitamin K and gla proteins in the pathophysiology of osteoporosis and vascular calcification. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3: 433-8.
13. Jono S, Ikari Y, Vermeer C, et al. Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification assessed by electron-beam computed tomography. *Thromb Haemost* 2004; 91: 790-4.
14. Schinke T, Amendt C, Trindl A, et al. The serum protein α_2 -HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. A possible role in mineralization and calcium homeostasis. *J Biol Chem* 1996; 271: 20789-96.
15. Schafer C, Heiss A, Schwarz A, et al. The serum protein α_2 -Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* 2003; 112: 357-66.
16. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* 2003; 361: 827-33.
17. Jono S, McKee MD, Murray CE, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2000; 87: E10-E17.
18. Giachelli CM. Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (Suppl): S300-S304.
19. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89: 747-54.
20. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390: 45-51.
21. Ibels LS, Alfrey AC, Haut L, Huffer WE. Preservation of function in experimental renal disease by dietary restriction of phosphate. *N Engl J Med* 1978; 298: 122-6.
22. Gimenez LF, Solez K, Walker WG. Relation between renal calcium content and renal impairment in 246 human renal biopsies. *Kidney Int* 1987; 31: 93-9.
23. Nagano N, Miyata S, Obana S, et al. Sevelamer hydrochloride, a phosphate binder, protects against deterioration of renal function in rats with progressive chronic renal insufficiency. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 16: 2014-23.
24. Cozzolino M, Dusso AS, Liapis H, et al. The effects of sevelamerhydro chloride and calcium carbonate on kidney calcification in uremic rats. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2299-308.
25. Katsumata K, Kusano K, Hirata M, et al. Sevelamer hydrochloride prevents ectopic calcification and renal osteodystrophy in chronic renal failure rats. *Kidney Int* 2003; 64: 441-50.
26. Cozzolino M, Staniforth ME, Liapis H, et al. Sevelamer hydrochloride attenuates kidney and cardiovascular calcifications in long-term experimental uremia. *Kidney Int* 2003; 64: 1653-61.
27. Hsu CH. Are we mismanaging calcium and phosphate metabolism in renal failure? *Am J Kidney Dis* 1997; 29: 641-9.
28. Brancaccio D, Tetta C, Gallieni M, Panichi V. Inflammation, CRP, calcium overload and a high calcium-phosphate product: a "liaison dangereuse". *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 201-3.
29. Walser M. Calcium carbonate-induced effects on serum $Ca \times P$ product and serum creatinine in renal failure: a retrospective study. *Adv Exp Med Biol* 1980; 128: 281-7.
30. Chertow GM, Burke SK, Lazarus JM, et al. Poly[allylamine hydrochloride] (RenaGel): a noncalcemic phosphate binder for the treatment of hyperphosphatemia in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1997; 29: 66-71.
31. Chertow GM, Burke SK, Dillon MA, Slatopolsky E. Long-term effects of sevelamer hydrochloride on the calcium \times phosphate product and lipid profile of haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 12: 2907-14.
32. Bleyer AJ, Burke SK, Dillon M, et al. A comparison of the calcium-free phosphate binder sevelamer hydrochloride with calcium acetate in the treatment of hyperphosphatemia in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 694-701.
33. Chertow GM, Burke SK, Raggi P, et al. Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002; 62: 245-52.