

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



MUDr. Markéta Kratochvilová¹

Oxidační a karbonylový stres u onemocnění ledvin
Oxidative and carbonyl stress in kidney diseases

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc., MBA, FASN, FERA¹

Konzultant: Prof. MUDr. Marta Kalousová, Ph.D.²

Praha, 2016

¹ Klinika nefrologie VFN a 1. LF UK Praha

² Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK Praha

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 29. března 2016

Kratochvilová Markéta

.....

Identifikační záznam

KRATOCHVILOVÁ, Markéta. *Oxidační a karbonylový stres u onemocnění ledvin [Oxidative and carbonyl stress in kidney diseases]*. Praha, 2016. 105 stran, přílohy 4. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika nefrologie. Školitel Tesař, Vladimír, konzultant Kalousová, Marta.

Poděkování

Velmi ráda bych vyjádřila poděkování svému školiteli prof. MUDr. Vladimíru Tesařovi, DrSc., MBA, FASN, FERA za odbornou pomoc a perfektní osobní přístup. Současně můj obrovský dík patří mé konzultantce prof. MUDr. Martě Kalousové Ph.D. za vedení práce v laboratoři a odbornou pomoc týkající se části o AGEs a sRAGE. MUDr. Janu Krtilovi z Ústavu lékařské biochemie 1. LF UK děkuji za spolupráci při práci s buněčnými kulturami, MUDr. Karin Malíčkové za odborné konzultace stran stanovování podocytů v moči a vedení práce v imunologické laboratoři na pracovišti Klinické imunologie a alergologie ÚKBLD VFN a 1.LF UK.

Bez možnosti využití vzorků pacientů na Klinice nefrologie VFN a 1. LF UK v Praze a metodického a personálního zázemí Ústavu lékařské biochemie 1. LF UK a Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK by nebylo možné tuto práci uskutečnit. Děkuji tedy všem, kteří se na tomto projektu v jakékoliv míře podíleli.

Tato práce byla podpořena výzkumnými projekty a granty:

- IGA MZ CR 8094-3
- MSM 0021620807
- GAUK 31/2004
- P25/LF1/2
- SVV 264 511, SVV 266 515 a SVV 260 031

Seznam tabulek a grafů

Tab. 1: Klinická, demografická a laboratorní charakteristika studijní skupiny a kontrol	s.40
Tab. 2: Charakteristika pacientů s chronickým onemocněním ledvin a zdravých kontrol	s.42
Tab. 3: Specifikace pacientů s proteinurií	s.54
Tab. 4: Typ nefropatie a hladiny AGEs	s.59
Tab. 5: Faktory související s AGEs. Multivariantní regresní analýza se sérovou hladinou AGEs jako nezávislou proměnou (vztaženo na věk a eGFR)	s.65
Graf 1: Separace Millipore	s.58
Graf 2: Korelace sérových hladin kreatininu a AGEs u pacientů s lupusovou nefritidou	s.60
Graf 3: Korelace sérových hladin kreatininu a AGEs u pacientů s IgA nefropatií	s.60
Graf 4: Logaritmická korelace AGEs s albuminem u pacientů s CKD 1-5	s.62
Graf 5: Logaritmická korelace AGEs s prealbuminem u pacientů s CKD 1-5	s.63
Graf 6: Logaritmická korelace AGEs s hemoglobinem u pacientů s CKD 1-5	s.64
Graf 7: Korelace sérových hladin sRAGE s koncentrací sérového kreatininu	s.66
Graf 8: Vztah mezi sérovými hladinami sRAGE a clearance kreatininu	s.67
Graf 9: Průtoková cytometrie - buňky označené monoklonálními protilátkami proti podocalyxinu a cytokeratinu	
Pacient F.B. s proteinurií 4,87g/den - první vyšetření	s.71
Graf 10: Pacient F.B. po 14 dnech imunosupresivní terapie - proteinurie 4,2g/den - druhé vyšetření	s.72

Abstrakt

Cíle: 1. Stanovení AGEs (Advanced Glycation End products) u pacientů s různými typy nefropatií. 2. Vztah AGEs s nutričními parametry a anémií. 3. Vliv renálních funkcí na hladiny sRAGE (soluble form of Receptor for Advanced Glycation End products). 4. Technika kultivace podocytů. 5. Stanovování podocytů v moči.

Metodika: Fluoreskující AGEs jsme stanovovali spektrofotometricky, sRAGE nekompetitivní sendvičovou ELISA metodou. Podocyty jsme dále pasážovali a identifikovali imunocytochemicky. Podocyty v moči jsme stanovovali průtokovou cytometrií.

Výsledky: 1. Nenalezli jsme signifikantní rozdíly v sérových hladinách AGEs mezi jednotlivými typy nefropatií, ač mají rozdílnou patogenezi. 2. Hladiny albuminu a prealbuminu korelují pozitivně a hladiny hemoglobinu negativně s hladinami AGEs u pacientů s CKD ve stádiu 1-5, bez nutnosti náhrady funkce ledvin. 3. Hladiny sRAGE se zvyšují u pacientů se sníženou renální funkcí nezávisle na příčině renálního onemocnění. 4. Osvojení postupů a technik kultivace podocytů. 5. Sledování citlivosti podocyurie ve vztahu k aktivitě onemocnění.

Závěr: Potvrdili jsme, že hladiny AGEs závisí více na renální funkci než na typu nefropatie a jsou ovlivněny nutričními parametry a hemoglobinem. Jako první jsme prokázali, že koncentrace sRAGE úzce koreluje s renální funkcí. Správná technika kultivace podocytů umožňuje využít tyto buněčné kultury k dalším pokusům. Podocyurie koreluje s aktivitou onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA: *chronické onemocnění ledvin, oxidační a karbonylový stres, konečné produkty pokročilé glykace, nefropatie, albumin, prealbumin, hemoglobin, solubilní receptor pro konečné produkty pokročilé glykace, podocyty, primokultura, immortalizované podocyty, podocyty v moči, podocyurie, proteinurie*

Abstract

Aims: 1. Determination of AGEs (Advanced Glycation End products) in patients with various types of nephropathy. 2. Association AGEs with nutritional parameters and anemia. 3. Influence of renal parameters on sRAGE (soluble form of Receptor for Advanced Glycation End products) levels. 4. Technics and proceeding methods of the podocytes cultivation. 5. Determination of urine podocytes.

Methods: We determined fluorescent AGEs by spectrofluorometry, sRAGE by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). Podocytes were passaged and identified immunocytochemically. Podocytes in urine were specified by flow cytometry method.

Results: 1. We did not find significant differences in AGEs serum levels among various types of nephropathy, even though the pathogenesis differs. 2. The albumin and prealbumin levels positively and haemoglobin levels negatively correlate with AGEs in patients with CKD grade 1-5, without necessity of dialysis. 3. Serum sRAGE levels are increased in patients with decreased renal function independently on the course of renal disease. 4. We implemented the methods and technics of podocyte cultivation. 5. Urine podocytes observation and confirmation that podocyturia relates to disease activity.

Conclusion: We confirmed that AGEs serum levels depend more on renal function than the type of nephropathy and are related to nutritional parameters and haemoglobin. We first demonstrated that serum sRAGE levels closely correlate with renal function. The correct cultivation technics of podocytes allows to use these cultures for further experiments. Podocyturia correlates with the disease activity.

KEY WORDS: *chronic kidney disease, oxidative and carbonyl stress, advanced glycation end products, nephropathy, albumin, prealbumin, haemoglobin, soluble receptor for advanced glycation end products, podocytes, primoculture, immortalized podocytes, podocytes in urine, podocyturia, proteinuria*

Seznam zkratek

AA	A Amyloid
A	Adenin
AAV	ANCA-Associated Vasculitides
ADAM-10	A Disintegrin and Metalloproteinase Domain containing Protein 10
AGER	Gene encoding RAGE Advanced Glycation End Products Receptor 1
AGE - R1	Advanced Glycation End Products Receptor 1
AGE - R2	Advanced Glycation End Products Receptor 2
AGE - R3	Advanced Glycation End Products Receptor 3
AGEs	Advanced Glycation End Products
AJKD	American Journal of Kidney Diseases
AL amyloid	Amyloid Light-chain
ALes	Advanced Lipoperoxidation End Products
ANA	Anti- Nuclear Antibodies
ANCA	Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies
ANOVA	Analysis of Variance
anti CR-1	anti Complement Receptor - 1
anti dsDNA	anti-double stranded DNA
anti Sm	Anti-Smith
AP-1	Activator Protein 1
AT2 receptor	Angiotensin II receptor type 2
AU	Arbitrary Units
B-CLL	B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumin
CD34	Cluster of Differentiation 34
Cdc42/Rac1	Cell Division Cycle 42/Ras Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1
CIK	Cirkulující imunokomplexy
CKD	Chronic Kidney Disease
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
CML	Carboxy-Methyllysine
cRAGE	cleaved Receptor for Advanced Glycation End Products
CRP	C - Reactive Protein
Da	Dalton
DAPI	4',6 Diamidino-2-Phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DM	Diabetes Mellitus
EGF	Epidermal Growth Factor
eGFR	estimated Glomerular Filtration Rate
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EN-RAGE	Extracellular Newly identified RAGE
ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinase ½
esRAGE	endogenous secretory RAGE
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
fl-RAGE	full-length-RAGE
FSC	Forward Scatter

FSGS	Focal Segmental Glomerulosclerosis
GBM	Glomerular Basement Membrane
GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry
GDP	Glucose Degradation Products
GLEPP 1	Glomerular Epithelial Protein 1
GLO I	Glyoxalase 1
GOLD	Glyoxallysine Dimer
GPx	Glutathione Peroxidase
GST	Glutathione S - Transferase
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCV	Hepatitis C virus
HD	Haemodialysis
HHE	4-Hydroxy-2-Hexenal
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMGB1	High Mobility Group Box-1 Protein
HNE	4-Hydroxy-2-Nonenal
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IGF 1	Insulin like Growth Factor 1
ICHDK	Ischemická choroba dolních končetin
ICHS	Ischemická choroba srdeční
IL 1	Interleukin 1
IgM	Immunoglobulin M
INF γ	Interferon γ
ITS	Insulin Transferin Selenium
JAK/STAT	Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
KAT	Katalasa
kDa	Kilodalton
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
K/DOQI	Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease
LDL	Low-Density Lipoprotein
LN	Lupus Nephritis
LOX-1	Lectin-type Oxidized LDL receptor 1
MAPK	p38 Mitogen-Activated Protein Kinase
MCD	Minimal Change Disease
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein
MDA	Malondialdehyde
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MGN	Membranous Glomerulonephritis
MGUS	Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance
MGO	Methylglyoxal
MMPs	Matrix Metalloproteinases
MOLD	Methylglyoxallysine Dimer
MPA	Microscopic Polyangiitis
MPGN	Membranoproliferative Glomerulonephritis
m-RAGE	membrane-bound- Receptor for Advanced Glycation End Products
μ m	Mikrometr
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B
NK	Natural Killer cells
nm	Nanometr
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAPP-A	Pregnancy Associated Plasma Protein-A
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCX	Podocalyxin
PD	Peritoneal Dialysis
PDGF	Plate Derived Growth Factor
PE	Antipodocalyxin
PFA	Paraformaldehyd
PPGS	Podocalyxin Positive Granular Structure
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End Products
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RPGN	Rapidly Progressive Glomerulonephritis
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SAA amyloid	Serum Amyloid A
SAPK/JNK	Stress Activated Protein Kinase/c-Jun NH2-Terminal Kinase
Se	Selenium
SLE	Systemic Lupus Erythematosus
SOD	Superoxide Dismutases
SSC	Side Scatter
sRAGE	soluble Receptor for Advanced Glycation End Products
SR-A	Scavenger Receptor A
SR-B1	Scavenger Receptor B1
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SV 40	Simian Virus 40
T	Thymin
TAg	Large Tumour Antigen
TLR4	Toll-Like Receptor 4
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
tsA58	Temperature sensitive A 58
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
WG	Wegener's Granulomatosis
WHO	World Health Organization
WT-1	Wilms Tumour protein - 1
Zn	Zinek
ZO-1	Zona Occuldens protein - 1

Obsah

1. Úvod	14
1.1. Oxidační a karbonylový stres.....	14
1.1.1. AGEs	16
1.1.2. RAGE	22
1.2. Nefropatie	27
1.3. Podocyty	31
1.3.1. Kultivace podocytů.....	31
1.3.2. Močové podocyty	35
2. Hypotézy a cíle práce	37
2.1. Klinicko-laboratorní studie	37
2.1.1. AGEs u nefropatií s mírnou renální insuficiencí	37
2.1.2. Asociace AGEs s nutričními parametry a anémií u pacientů s chronickým onemocněním ledvin	37
2.1.3. Vliv funkce ledvin na hladiny sRAGE u pacientů s chronickým onemocněním ledvin	37
2.2. Experimentální studie	37
2.2.1. Kultivace podocytů.....	37
2.2.2. Detekce podocytů v moči u pacientů s onemocněním ledvin	37
3. Materiál a metodika	38
3.1. Pacienti a kontroly, odběr vzorků krve a moči	38
3.1.1. AGEs u nefropatií s mírnou renální insuficiencí	38
3.1.2. Asociace AGEs s nutričními parametry a anémií u pacientů s chronickým onemocněním ledvin	39 39
3.1.3. Vliv funkce ledvin na hladiny sRAGE u pacientů s chronickým onemocněním ledvin	41
3.2. Stanovení laboratorních parametrů	43
3.2.1. AGEs	43
3.2.2. sRAGE.....	45
3.2.3. Další parametry.....	46
3.3. Použité statistické analýzy	47

3.4.	Kultivace podocytů	48
3.4.1.	Příprava primokultur a pasážování	48
3.4.2.	Imunocytochemické stanovení podocytárních markerů	51
3.5.	Vyšetření podocytů v moči	53
3.5.1.	Pacienti a vzorky moče	53
3.5.2.	Metodika	55
	Příprava močového sedimentu	55
	Zjištění viability buněk	55
	Značení buněk monoklonálními protilátkami	56
4.	Výsledky	59
4.1.	Klinicko-laboratorní studie	59
4.1.1.	AGEs u nefropatií s mírnou renální insuficiencí	59
4.1.2.	Asociace AGEs s nutričními parametry a anémií u pacientů s chronickým onemocněním ledvin	61
4.1.3.	Vliv funkce ledvin na hladiny sRAGE u pacientů s chronickým onemocněním ledvin	66
4.2.	Experimentální studie	68
4.2.1.	Kultivace podocytů	68
4.2.2.	Detekce podocytů v moči u pacientů s onemocněním ledvin	70
5.	Diskuse	73
5.1.	Klinicko-laboratorní studie	73
5.2.	Experimentální studie	81
6.	Závěr	86
6.1.	Klinicko-laboratorní studie	86
6.1.1.	AGEs u nefropatií s mírnou renální insuficiencí	86
6.1.2.	Asociace AGEs s nutričními parametry a anémií u pacientů s chronickým onemocněním ledvin	86
6.1.3.	Vliv funkce ledvin na hladiny sRAGE u pacientů s chronickým onemocněním ledvin	86
6.2.	Experimentální studie	87
6.2.1.	Kultivace podocytů	87

6.2.2. Detekce podocytů v moči u pacientů s onemocněním ledvin	87
7. Bibliografie	88
8. Přehled publikací	102
8.1. Publikace, které jsou podkladem dizertační práce	102
8.2. Publikace bez vztahu k tématu disertační práce	103
9. Příložené publikace	105

1. Úvod

1.1. Oxidační a karbonylový stres

Patogeneze celé řady onemocnění a jejich komplikací souvisí s oxidačním a karbonylovým stresem, který je již delší dobu velmi častým předmětem mnoha výzkumů nejen v oblasti medicíny.

Oxidační stres vzniká následkem nadměrné produkce ROS (Reactive Oxygen Species) a RNS (Reactive Nitrogen Species), nedostatečnou funkcí antioxidačního ochranného systému či kombinací obou těchto možností a má za následek tkáňové poškození (1). Reaktivní karbonylové sloučeniny mohou vznikat ze sacharidů, lipidů i aminokyselin, oxidační i neoxidační cestou.

K poškození proteinů může docházet například oxidativní modifikací aminokyselinových zbytků, hydroxylací aromatických aminokyselin působením hydroxylového radikálu, nitrací aromatických aminokyselin peroxynitritem či agregací a síťováním proteinů reaktivními aldehydy. Některé ROS a RNS vedou oxidací aminokyselinových zbytků ke ztrátě enzymové, transportní či signální funkce proteinu. S proteiny reagují i alkoxylové a peroxylové radikály lipidů a reaktivní aldehydy, následně dochází k agregaci proteinů, zesíťování, proteolytické degradaci modifikovaných proteinů a změnám v antigenicitě.

Vlivem ROS a RNS může docházet k uvolnění purinové a pyrimidinové báze z řetězce nukleových kyselin, s následným možným přerušením polynukleotidového řetězce nebo vytvořením křížových vazeb mezi DNA a proteiny. Následkem takových změn je chybné párování bazí při replikaci DNA, vedoucí k chybě v genetické informaci (1).

Proces lipoperoxidace je radikálová řetězová reakce, do které jsou zapojeny mastné kyseliny (PUFA – polyunsaturated fatty acid). Působením radikálů z nich vznikají lipoperoxylové radikály. Primárními produkty lipoperoxidace jsou hydroperoxyly, které podléhají dalším změnám za vzniku sekundárních produktů – hydroxyaldehydů (malondialdehyd, 4-hydro-2-nonenal, 4-hydroxy-2-hexenal), které jsou velmi reaktivní a pro organismus toxické (2). V biologických systémech probíhají dva různé typy lipidové peroxidace: enzymová a neenzymová.

Enzymová peroxidace lipidů probíhá v aktivních centrech hydroperoxidáz a endoperoxidáz (cyklooxygenáza, lipoxygenáza), dochází k produkci biologicky aktivních látek (prostaglandiny, leukotrieny), které jsou důležité pro řízení buněčných dějů, signalizaci a řadu dalších pochodů. Volné radikály v tomto případě nejsou uvolňovány z aktivních center enzymů do okolí a nejsou tudíž pro organismus škodlivé.

Neenzymová peroxidace lipidů je v podstatě nekontrolovatelná a patologická. Probíhá především v biologických membránách a lipoproteinech. Právě v membránách jsou přítomny fosfolipidy s největším zastoupením PUFA (hlavními substráty lipoperoxidace). Dvojná vazba oslabuje vazbu C-H, a proto PUFA a lipidy podléhají peroxidaci snadněji než jiné molekuly. Mění se fluidita, permeabilita membrán, membránový potenciál a současně dochází k ovlivnění membránově vázaných enzymů a tvorbě chemoatraktivních látek pro makrofágy.

Mezi markery časného poškození oxidačním stresem patří např. F₂-isoprostany, sloučeniny z rodiny prostaglandinů, které jsou produkovány primárně in vivo peroxidací polynenasycených mastných kyselin s více než jednou dvojnou vazbou. Vzhledem k jejich mechanismu vzniku, chemické stabilitě a možnosti kvantifikace citlivými metodami se jedná o vhodný marker oxidačního stresu a lipoperoxidace (3). Velmi studovaným produktem lipoperoxidace je např. malondialdehyd (MDA), vysoce toxický aldehyd, existující především v enol-formě. Vede k zesíťování (cross-linking) a polymeraci proteinů a nukleotidů s jejich následnou mutací. Zesíťování a polymerace částí buněčných membrán mění jejich vlastnosti. MDA má význam jako hlavní marker stanovení míry lipoperoxidace a oxidačního stresu. Mezi další markery časného poškození oxidačním stresem, vzhledem k jejich patologickým účinkům, patří podobně i HNE (4-hydroxy-2-nonenal) a HHE (4-hydroxy-2-hexenal) (4).

K markerům pokročilého poškození oxidačním stresem patří produkty pokročilé glykace nebo též produkty pokročilé glykoxidace - AGEs (Advanced Glycation End products), které jsou jedním z hlavních témat práce.

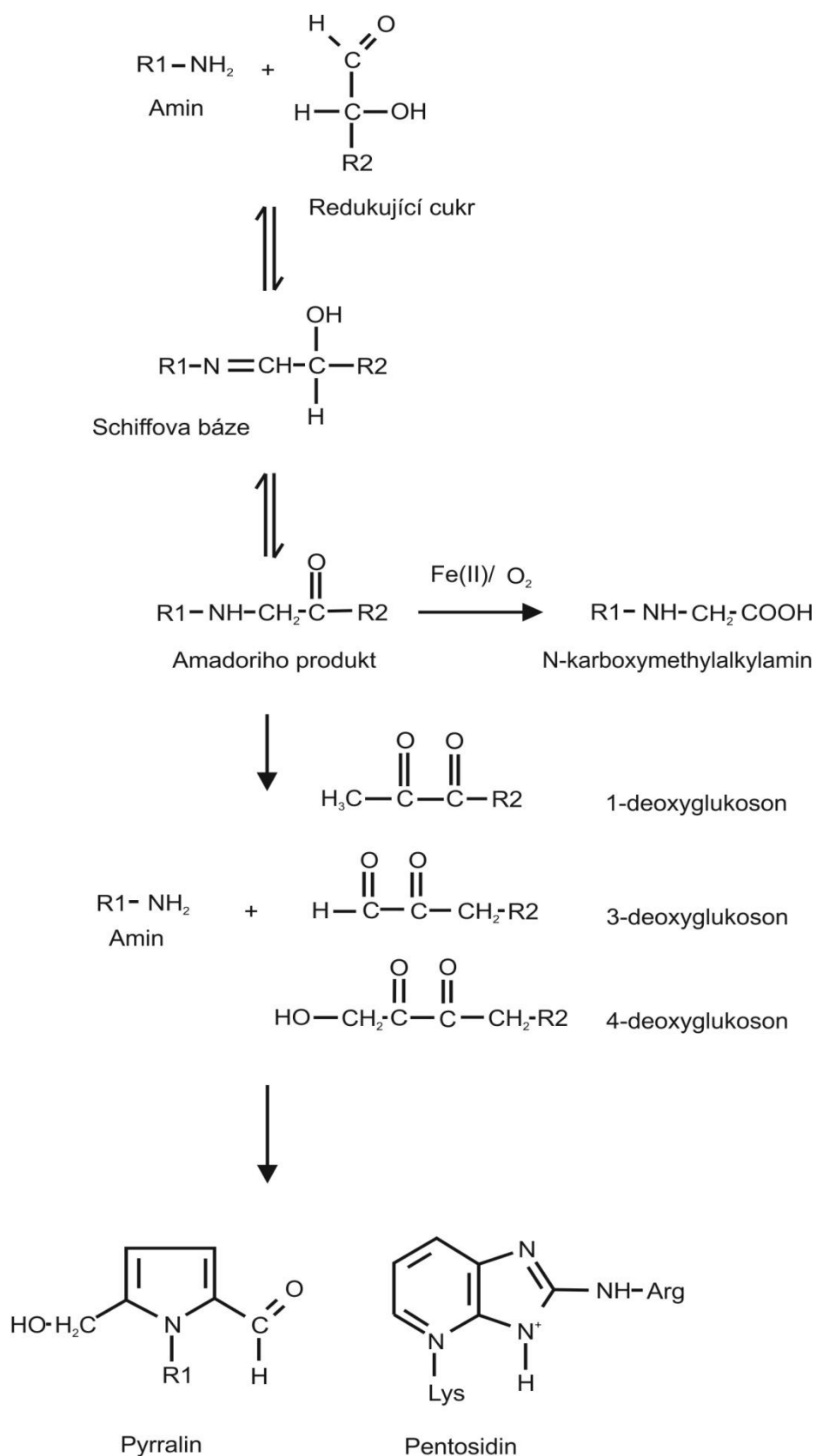
1.1.1. AGEs

Produkty pokročilé glykace (AGEs) byly poprvé popsány francouzským chemikem Maillardem již v roce 1912 (5).

AGEs mohou vznikat nejčastěji spontánně neenzymatickou glykací, tzv. Maillardovou reakcí, která probíhá ve třech krocích: iniciace, propagace a terminace (Obr. 1).

Reakce je iniciována neenzymovou kondenzací aldehydové skupiny redukujícího cukru a primární ϵ -aminoskupiny (lysinových zbytků) proteinů vedoucí ke vzniku nestabilní Schiffovy báze. Tato reakce je závislá na koncentraci sacharidů. Schiffova báze podléhá, při pokojové teplotě a fyziologickém pH, přesmyku vedoucímu k tvorbě více stabilního ketoaminu, nazývaného Amadoriho produkt (tzv. časná fáze). Reakce je částečně reverzibilní. V závislosti na pH dochází k enolizaci Amadoriho produktu s následným vznikem derivátů furfuralu, dále cestou dikarboxylových meziproduktů vnikají reduktony. Tvorba heterocyklických produktů, inter- a intramolekulárních můstků a dehydratace jsou reakce podílející se na propagaci Maillardovy reakce. Zpětnou aldolovou fragmentací, za přítomnosti iontu kovu nebo oxidativním štěpením dochází z Amadoriho produktu k tvorbě dikarbonylů.

Koncové produkty nebo-li AGEs jsou termodynamicky stabilní a terminují Maillardovu reakci (tzv. fáze pozdní – trvající týdny až měsíce) (6). Tyto další reakce již nejsou závislé na koncentraci sacharidů. Oxidační a karbonylový stres vznik těchto produktů urychluje (7).



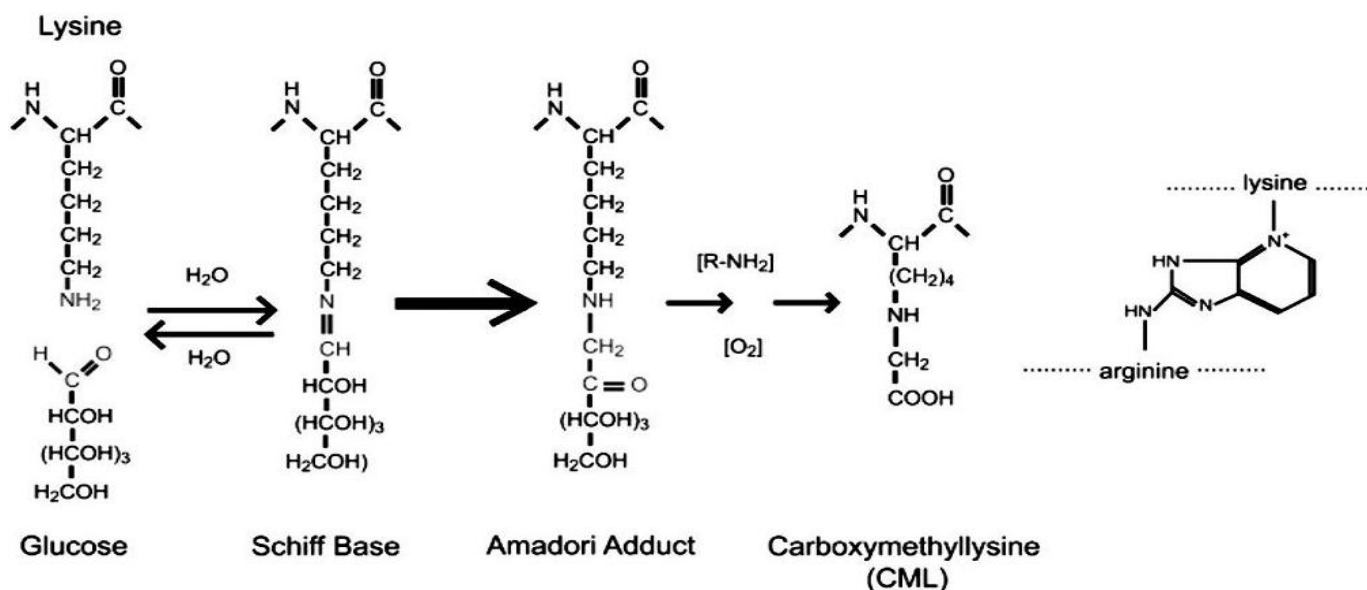
Obrázek 1: Schéma glykace (Obšil, 1997; překresleno) (6)

Dalším zdrojem jsou exogenní AGEs např. z potravy, jedná se především o tzv. západní stravu, jelikož přednostně využívá technologické procesy jako je smažení, fritování, pečení nebo grilování, při kterých je dosahováno vysokých teplot či inhalace cigaretového kouře. Glykotoxiny z cigaret jsou z alveol transportovány do plicní tkáně a krevního oběhu, kde mohou reagovat s jinými produkty glykace a vytvářet AGEs.

Pro celou řadu produktů pokročilé glykace je charakteristická žlutohnědá pigmentace, typické spektrum fluorescence (excitace při 350 nm a emise při 430 nm), schopnost vzájemného zesítnění (crosslinking) a jejich reakce se specifickými receptory (8). Každopádně existuje řada AGEs, které tuto charakteristickou vlastnost nemají. Dodnes byla objasněna struktura více než 20 různých AGEs.

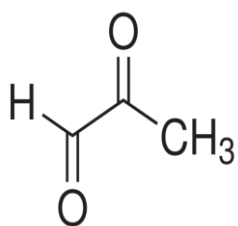
Pentosidin vykazuje fluorescenci a má schopnost zesítnění. Vzniká při reakci mezi pentózami a lysinovými nebo argininovými zbytky, či z jiných sacharidových zdrojů jako je glukóza, fruktóza a askorbát za aerobních podmínek. V případě reakce z jiných zdrojů je výtěžnost nižší. K zesítnění dochází po reakci N-acetyllysinu s glukózou. Alternativně může pentosidin vznikat v průběhu lipidového metabolismu, například oxidací polynenasycených mastných kyselin a arachidonové kyseliny. Tyto produkty se pak nazývají produkty pokročilé lipoperoxidace (Advanced lipoperoxidation End products - ALEs). Ve tkáních je pentosidin přítomen ve stopových koncentracích a tvoří pouze zlomek celkových modifikací lysinových a argininových zbytků proteinů. Koncentrace pentosidinu slouží především jako důležitý ukazatel poškození proteinů v důsledku glykace závislé na sacharidech (9).

N-karboxymetyllysin (CML) vznikající reakcí glyoxalu s aminoskupinou lysinu nevykazuje fluorescenci a nemá schopnost zesítnění. Předpokládá se, že je tvořen při oxidační reakci fruktosolysinu, produktu glukózy a lysinu. Současně se také může vytvářet během oxidace kyseliny askorbové. Také reakce mezi lysinem a dikarboxyly, které vznikají při glykaci (glyoxal, methylglyoxal), může vést k tvorbě CML. Oproti jiným AGEs je CML stabilní vůči kyselinám a může sloužit jako indikátor Maillardovy reakce v biologických i potravních systémech (10).



Obrázek 2: Vznik karboxymetyllysinu (Bohlender, 2005; překresleno) (11)

Metylglyoxal (pyruvátaldehyd, 2-oxopropanol) je reaktivní α -oxoaldehyd obsahující jak ketonovou, tak i aldehydovou skupinu (12). MGO může vznikat enzymaticky (např. při glykolýze, při metabolismu acetonu a threoninu), tak neenzymaticky. Reakcí katalyzovanou enzymem metylglyoxalsynthasou vzniká poté z dihydroxyacetonfosfátu MGO (13). Jedná se o hlavní cestu produkce metylglyoxalu v mikroorganismech, vyskytující se i u savců. Další možností je vznik MGO z acetoacetátu, v průběhu této reakce vznikají volné radikály. Produkce metylglyoxalu je indukována intracelulárně, především v endotelových buňkách. Tvorba AGE proteinů velmi úzce souvisí právě s modifikací proteinů metylglyoxalem. AGE vznikající reakcí s MGO mají především modifikovaná argininová rezidua a minoritně modifikované lysinové zbytky, oproti glukosou modifikovaným proteinům, kde převažuje modifikace lysinových reziduí. Metylglyoxalem modifikované proteiny se vážou na buněčný povrch monocytů a makrofágů (14). Takto modifikované proteiny dále podstoupí receptorem-zprostředkovanou endocytózu a lysozomální degradaci. Vazba metylglyoxalem modifikovaných proteinů na monocyty také indukuje syntézu a sekreci prozánětlivých cytokinů. Metylglyoxal byl prokázán jako parametr charakteristický vysokou senzitivitou ke kolísání glykémie (15).



Obrázek 3: Vzorec metylglyoxalu

Hlavní cesta degradace metylglyoxalu vede přes glyoxalový systém. Tento systém zahrnuje dva enzymy: glyoxalasu I a glyoxalasu II a katalytické množství glutathionu. Aktivita glyoxalasy I klesá v případě rostoucí koncentrace metylglyoxalu.

Pyrralin je pyrolová sloučenina citlivá vůči kyselinám, vznikající při reakci mezi lysinem a 3-deoxyglukosou, která je degradačním produktem redukujících cukrů a aminoketóz. Pyrralin je možné použít jako indikátor konečných kroků Maillardovy reakce.

Glyoxal-Lysin Dimer (GOLD) je dilysin-imidazolová sůl, která se vytváří při reakci glyoxalu a dvou molekul lysinu. Methylglyoxal-lysin dimer (MOLD) je podobně dilysin-imidazolová sůl, ale vytváří se při reakci metylglyoxalu se dvěma molekulami lysinu. GOLD a MOLD jsou považovány za velmi důležitou součást Maillardovy reakce.

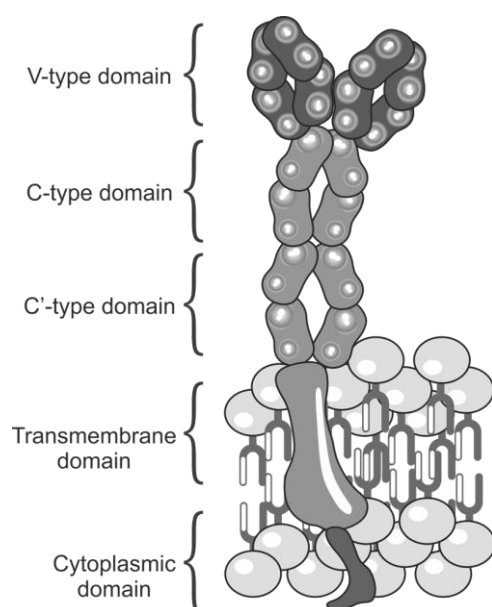
Obecně tedy mohou vést AGEs přímo ke změnám vlastností extracelulární matrix, mohou se vázat na proteiny a měnit jejich fyzikální a chemické vlastnosti. Dále mohou vést ke zvýšení rezistence k termickému a enzymatickému poškození, zvyšovat stabilitu vůči kyselinám, měnit rozpustnost molekul a způsobovat zesílení molekul.

Nepřímo mohou AGEs způsobovat poškození pomocí specifických receptorů, kterých byla v současné době popsána celá řada. Nejdůležitější RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products), dále AGE - R1 (type I Integral Membrane Protein), účastníci se při endocytóze AGEs, AGE - R2 (AGE Inducible Tyrosine-Phosphorylated Protein), který je zapojen do buněčné signalizace a AGE - R3 (Galectin 3), důležitý pro detoxifikaci AGEs. Mezi další receptory vázající AGEs patří scavengerové receptory třídy A (SR-A), třídy B (SR-B1) makrofágů, LOX-1, fasciclin, EGF, megalin, TLR4 a další (16).

Neenzymatická glykace, oxidační a karbonylový stres, funkce ledvin, obrat proteinů a potrava jsou faktory, které mohou ovlivňovat hladinu AGEs v organismu (17). AGEs hrají důležitou roli v patogenezi mnoha onemocnění.

1.1.2. RAGE

Jedním z mechanismů uplatnění AGEs je tedy jeho působení přes receptor pro AGEs (RAGE - Receptor for Advanced Glycation End products), jeden z novějších členů imunoglobulinové superrodiny. Gen kódující tento protein se nachází na chromosomu 6 (18). Tento multiligandový receptor se skládá z extracelulární části tvořené dvěma doménami typu C (constant) a navazující doménou typu V (variable), sloužící k navázání ligandů pomocí N glykosylovaných částí (Obr. 4). Další částí je transmembránová doména, na kterou navazuje cytoplasmatický ocas, u kterého se předpokládá, že se zásadně podílí na intracelulární signalizaci (19; 20). RAGE se vyskytuje v celé velikosti fl-RAGE („full-length“ forma) či vázající se na membránu m-RAGE („membrane-bound“ forma). Produkce RAGE je zahájena, začne-li se AGE ligand hromadit, tento mechanismus je příkladem pozitivní zpětné vazby (21). Silným indukčním činitelem RAGE signalizace je například CML, zatímco pyrralin a pentosidin signalizaci RAGE nenavozují (22). Ve vyšší koncentraci je RAGE exprimováno např. u zralých pneumocytů typu I a u embryonálních buněk (23). Velmi významnou roli hraje RAGE signalizace u diabetu a imunitní odpovědi (24).



Obrázek 4: Receptor pro produkty pokročilé glykace (RAGE)(Basta, 2008; překresleno) (25)

RAGE je schopen vázat kromě AGEs i modifikované lipoproteiny o nízké hustotě, amyloid β peptid, amfoterin (HMGB1) a některé zástupce rodiny S 100 proteinů (22). Ligandy se váží k receptoru RAGE nejčastěji prostřednictvím V-domény pomocí elektrostatických sil, které vznikají mezi kladně nabitou ektodoménou RAGE a negativně nabitým ligandem (26).

Amyloid β peptid se skládá nejčastěji z 36-43 aminokyselin a vyskytuje se v monomerní, rozpustné oligomerní formě nebo může vytvářet nerozpustné agregáty a fibrily. Například v neuronech dochází k reakci s V nebo C-doménou RAGE, který následně aktivuje NF- κ B (27).

HMGB1 (Amfoterin) je jediný zástupce ze skupiny HMGB (High Mobility Group), který je schopný aktivace RAGE. Vyskytuje se jak extra tak intracelulárně. Amfoterin je sekretován aktivně makrofágy, NK buňkami, zralými dendritickými buňkami a pasivně nekrotickými buňkami (27).

Je známo více než 25 různých lidských proteinů S100. Většina S100 proteinů existuje ve formě homodimerů, jsou lokalizovány v cytoplazmě nebo se mohou vyskytovat výhradně extracelulárně, kde vykazují vlastnosti podobné cytokinům. S100 proteiny jsou exprimovány v srdeční tkáni a svalech (S100A1), v plicích a ledvinách (S100A2), neuronech (S100A4, S100B), fibroblastech, epitelálních buňkách (S100A6), keratinocytech (S100A7), granulocytech, monocytech, makrofázích (S100A8/9) či v placentě (S100P).

Intracelulárně, kontrolují S100 proteiny různé buněčné aktivity závislé na Ca^{2+} . V nízké koncentraci Ca^{2+} mají S100 proteiny hydrofilní strukturu, v případě vysoké koncentrace Ca^{2+} navázáním těchto iontů odhalují hydrofobní místa, která jim umožňují interagovat se specifickými cílovými proteiny, mezi které patří membrány, cytoskeleton, transkripční faktory, enzymy, kanály, receptory a signální molekuly (28).

Vysoká koncentrace vápníku v extracelulárním prostoru vede k vazbě na S100 protein, reakci nezbytné pro interakci s receptorem RAGE (26). Extracelulární S100 proteiny existují v hydrofobním stavu, reagují s lipidovou složkou buněčné membrány a mění membránovou aktivitu kanálů nebo působí na membránové receptory.

EN-RAGE – kalcium vázící protein S100A12 je endogenní ligandou s největší významností právě pro RAGE. Je exprimovaný na makrofázích, lymfocytech a endotelálních buňkách. Je lokalizován intracelulárně, ale je známo, že je sekretován i do extracelulární oblasti. Může interagovat se scavengerovými receptory, působí chemotakticky na neutrofily a monocyty a v případě vazby s mědí se účastní tvorby oxidačních látek (29).

Dlouhodobě se předpokládalo, že extracelulární EN-RAGE interaguje pouze s RAGE. V posledních letech bylo prokázáno, že EN-RAGE interaguje také s non-RAGE receptory na buněčném povrchu na mastocytech a monocytech. Jedním z non-RAGE receptorů je např. „G-Protein Coupled Receptor“ (18).

Bylo prokázáno, že vazba ligandu na RAGE receptor vede k aktivaci celé řady signálních drah – ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2), Cdc42/Rac1 (Cell Division Cycle 42/Ras Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1), SAPK/JNK (Stress Activated Protein Kinase/c-Jun NH2-Terminal Kinase), MAPK (p38 Mitogen-Activated Protein Kinase), JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) (26). Velké množství RAGE signálních drah konverguje na úrovni aktivace NF- κ B transkripčního faktoru či dalších transkripčních faktorů jako například AP-1 (Activator Protein 1) a STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) (30). NF- κ B je jaderný faktor B lymfocytů a jeho nejsilnějším aktivátorem je TNF- α . Spuštěním signální kaskády vedoucí k aktivaci výše zmíněných transkripčních faktorů dochází ke stimulaci transkripce genů pro cytokiny, růstové faktory (TNF- α , IL 1, PDGF, IGF 1, interferon γ) a adhezivní molekuly (ICAM-1, VCAM-1). Současně dochází ke stimulaci buněčné proliferace, zvýšení vaskulární permeability, indukci migrace makrofágů atd. (21).

Solubilní forma RAGE (sRAGE) jedná se o zkrácenou formu RAGE, postrádající transmembránovou oblast. Vzniká alternativním sestřihem genu pro RAGE a je lokalizovaná extracelulárně. Jednou z forem je endogenně secernovaný „endogenous secretory“ RAGE (esRAGE), který má extracelulární doménu pro navázání ligandů RAGE, ale chybí mu intracelulární část podporující intracelulární signální transdukcii, je tedy sekretován z buněk (31). Další variantou je tzv. „cleaved“ RAGE (cRAGE), který vzniká proteolytickým odštěpením z buněčného povrchu receptoru RAGE vlivem MMPs (Metaloproteináz) nebo ADAM-10 (A Desintegrin And Metalloprotease). Řadíme je mezi tzv. „decoy“ receptory, což jsou analogy receptorů RAGE, které postrádají cytoplazmatickou část a po navázání ligandu nedojde k přenosu signálu do nitra buňky. Obě formy cirkulují v plazmě, kde působí jako „návnada“ pro RAGE ligandy. Tyto sekretované varianty společně tvoří celkové množství solubilních RAGE, které mohou být detekovány v plazmě. Forma sRAGE reprezentuje přirozeně se vyskytující inhibitor účinků zprostředkovaných RAGE (32).

Patologické působení AGEs je možné ovlivnit inhibicí jejich tvorby, stimulací jejich degradace či blokováním receptoru RAGE (33; 34).

Samotný organismus má několik možností jak se AGEs bránit. Velmi důležitý je enzym glyoxalasa, která snižuje hladiny metylglyoxalu a glyoxalu, které jsou největším poolem AGEs in vivo. Dalším enzymem je aldosa reduktáza a aldehyd dehydrogenáza, které se účastní degradace prekursorů AGEs. Tkáňové AGEs jsou odstraňovány většinou endocytosou makrofágy nebo endoteliálními buňkami, fibroblasty či mezangiálními buňkami. Po endocytose podléhají AGEs proteolýze, následované tvorbou AGE peptidů (s nízkou molekulovou hmotností), které mohou být eliminovány renálně (16). Jako reakce na patologické působení AGEs, může v organismu docházet ke snížení nadměrné tvorby ROS (regulací aktivity enzymů, které radikály tvoří), k zachytu a odstranění již vzniklých radikálů pomocí vychytávačů (scavengers) nebo zhasěčů (quenchers) či ke snížení intenzity radikálových reakcí vyvázáním tranzitních prvků (zejména dvojmocného železa) z reaktivních pozic (ferritin, transferin). Enzymové antioxidační systémy mohou vytvářet s ROS méně toxický produkt či jej přímo rozkládat. SOD (superoxiddismutáza) katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku. GPx (glutathionperoxidázy) odstraňují intracelulární hydroperoxydy, vzniklé v průběhu lipoperoxidace nenasycených mastných kyselin. GST (glutathiontransferázy), cytosolové enzymy, mají úlohu při detoxikaci cizorodých látek, například xenobiotik. Substrátem těchto enzymů je hydroxynonenal. Či KAT (kataláza), která je svou strukturou podobná hemoglobinu.

Další skupinou jsou vysokomolekulární antioxidyanty, mezi které patří například transferin, laktoferin, ferritin, haptoglobin, hemopexin, albumin atd.

Poslední skupinou jsou nízkomolekulární antioxidyanty jako např. vitamin C, který je důležitým redukčním činidlem, redukuje jak anorganické, tak i organické radikály a ROS. Po redukcí tokoferolového radikálu se mění na askorbylový radikál, podstatně méně reaktivní, který se dále regeneruje za účasti NADH zpět na askorbát. Biologicky nejúčinnější a nejaktivnější formou vitaminu E je α -tokoferol, lipofilní antioxidant membrán, rozpustný v tucích. Během lipoperoxidace zneškodňuje peroxylové radikály mastných kyselin. Ubichinon (koenzym Q) je skupina benzochinonů, které společně s tokoferolem tlumí účinky radikálových reakcí v membránách. Glutathion, kyselina lipoová, homocystein a taurin významně potlačují radikálové reakce. A konečně karotenoidy, lipofilní antioxidyanty plazmy, vyskytující se v plazmě vázány na LDL, které chrání před lipoperoxidací. Mezi další patří například bilirubin a kyselina močová.

Některé syntetické inhibitory účinkují v časně fázi glykace tak, že zasahují do reakcí mezi redukujícími cukry a aminoskupinami, čímž inhibují vznik Schiffovy báze a tím pádem i vznik AGEs. Například kyselina acetylsalicylová inhibuje glykaci prostřednictvím acetylace volných aminoskupin proteinů a tím blokuje navázání redukujících cukrů. Většina syntetických inhibitorů však hraje roli v prevenci vzniku AGEs v pozdějších stádiích glykace, například prostřednictvím odklizení reaktivních karbonylů a radikálů vytvořených během glykace nebo také blokováním tvorby Amadoriho produktů. Mezi typické patří aminoguanidin a pyridoxamin (35). Syntetické inhibitory mohou mít celou řadu vedlejších účinků (gastrointestinální obtíže, anémie, příznaky chřipkového onemocnění).

Přírodní produkty jsou v porovnání se syntetickými relativně bezpečné. Rostlinné extrakty, frakce a směsi jsou již několik let zkoumány pro možné inhibiční účinky na AGEs. Patří mezi ně například extrakt z česneku, kořen ženšenu, ovoce a zelenina, extrakty zeleného čaje a další. Pyridoxamin je jednou z forem vitamínu B6 u něhož byla objevena vlastnost inhibovat Maillardovu reakci. Mechanismus účinku spočívá v inhibici kroků po vytvoření Amadoriho produktů a to pomocí izolace katalytických kovových iontů a blokováním oxidační degradace Amadoriho meziproduktů. Pyridoxamin také vychytává toxické karbonylové produkty degradace cukrů a lipidů a inhibuje reaktivní formy kyslíku (36).

1.2. Nefropatie

Onemocnění ledvin na úrovni glomerulů může být zánětlivé nebo nezánětlivé povahy. Glomerulonefritidy vznikají v důsledku aktivace imunitních mechanismů, většinou, ale ne vždy se zánětlivými změnami v glomerulech. V případě sekundárních forem je glomerulární postižení obvykle jedním z projevů systémového onemocnění. Strukturálně jsou glomerulonefritidy charakterizovány zvýšenou buněčností (proliferací) glomerulů a/nebo změnami glomerulární kapilární stěny. Zvýšená propustnost glomerulární kapilární stěny pro plazmatické bílkoviny vede k nálezů proteinurie, defekty v glomerulární kapilární stěně vedou k hematurii. Poškození a následný zánik glomerulů, současně s jizvením renálního intersticia, pak mohou u těžších forem glomerulonefritidy vést k poklesu glomerulární filtrace a postupnému rozvoji chronické renální insuficience až chronického selhání ledvin (37; 38). Dle průběhu onemocnění dělíme glomerulonefritidy na akutní, rychle progredující a chronické. Blíže se zaměřím především na nefropatie, kterými se zabývá tato práce.

Rychle progredující glomerulonefritidy (RPGN) se vyvíjejí nejčastěji na podkladě **ANCA-asociované vaskulitidy** (AAV). Vaskulitidy jsou charakterizované zánětlivou infiltrací cévní stěny s možnou následnou poruchou perfúze zásobených orgánů až úplnou destrukcí postižené cévy. Postižení ledvin vede k rychlému zhoršování renální funkce s možností rozvoje renálního selhání. Podle Jennetta a Falka dělíme AAV na mikroskopickou polyangiitidu - MPA (vaskulitida bez astmatu a granulomů), Wegenerovu granulomatózu – WG (vaskulitida s granulomy bez astmatu) a syndrom Churga a Straussově (vaskulitida s eosinofilií, astmatem a granulomy). Další možností je renálně limitovaná vaskulitida, omezená pouze na ledviny. Nemocní mají ve většině případů pozitivní protilátky proti cytoplazmě neutrofilních leukocytů (ANCA) (37; 39; 40; 41).

Součástí řady chronických glomerulonefritid může být nefrotický syndrom, který je charakterizován velkou (nefrotickou) proteinurií (u dospělých > 3,5 g/24 hodin, u dětí > 40 mg/m²), hypoproteinémií, hypalbuminémií, hyperlipidémií a periferními otoky. Nefrotická proteinurie je způsobena zvýšenou propustností glomerulární kapilární stěny pro makromolekuly, jejíž příčinou je postižení podocytů (37; 42).

Nefrotický syndrom s minimálními změnami (MCD – Minimal Change Disease) je typický izolovanou selektivní proteinurií (albuminurií) bez hematurie a hypertenze, postihuje nejčastěji děti předškolního věku a bývá provázen výraznými otoky, které mohou mít rozsah anasarky (37; 43).

Fokálně segmentární glomeruloskleróza (FSGS) je nepříznivá varianta nefrotického syndromu s minimálními změnami. Většinou bývá přítomna asymptomatická neselektivní proteinurie nebo plně vyvinutý nefrotický syndrom, malá erytrocyturie (u 25–75 %) a hypertenze (u 30–50 %). Existují i sekundární formy FSGS, např. u jednostranné ageneze ledviny, v solitární ledvině po jednostranné nefrektomii v dětském věku, následkem vezikoureterálního refluxu, u morbidní obezity, u kongenitálních cyanotických srdečních vad, u HIV nebo u heroinové nefropatie (37; 44).

Membránózní glomerulopatie (MGN) je třetí nejčastější příčinou nefrotického syndromu (s maximem u osob nad 40 let) a klinicky je těžko odlišitelná od FSGS. Přibližně u 50% nemocných je přítomna mikroskopická hematurie. Při zjištění diagnózy bývá renální funkce v normě a trombotické komplikace nefrotického syndromu u pacientů s MGN jsou častější (37; 45).

IgA nefropatie (Bergerova choroba) je celosvětově nejčastější glomerulonefritidou (mesangiálně proliferativního typu) s výraznými rozdíly v prevalenci mezi jednotlivými geografickými oblastmi. Je charakterizovaná epizodami na infekci vázané makroskopické hematurie či trvalou mikroskopickou hematurií s přítomností difuzních mesangiálních depozit IgA v glomerulech. Proteinurie je obvykle malá (do 1g/24 hodin) a může se zvyšovat při progresi onemocnění. Epizody makroskopické hematurie, které jsou častější u dětí, jsou typicky vázány na začátek infekce (nejčastěji horních dýchacích cest s časovým odstupem 24–72 hodin). Chronická renální insuficience je přítomna v době diagnózy až u 20 % nemocných (37; 46; 47).

Mezi sekundární glomerulonefritidy patří lupusová nefritida, která je velmi závažným onemocněním ledvin při **systémovém lupus erytematodes (SLE)**.

SLE je klinicko-laboratorní syndrom, který je definován klinickým obrazem a přítomností autoprotilátek. Pacient musí splňovat alespoň 4 z 11 kritérií Americké College of Rheumatology, mezi něž patří motýlový erytém, diskoidní kožní lupus, fotosenzitivita, vředy v dutině ústní, neerozivní artritida, pleuroperikarditida, postižení ledvin, neurologické postižení, hematologické postižení, přítomnost autoprotilátek (anti dsDNA, anti Sm, ANA) a pozitivní imunofluorescence. Postižení ledvin se vyskytuje u 35-75% pacientů se SLE. Typickými klinickými projevy lupusové nefritidy je proteinurie (která bývá u 50% pacientů nefrotická), mikroskopická glomerulární hematurie, relativně častá je i leukocyturie, porucha tubulárních funkcí a bohužel i postupný pokles renálních funkcí.

Běžně je užívána histologická klasifikace dle WHO, rozlišujeme několik typů nefritid. I – minimální mezangiální lupoidní nefritida (LN), II – mesangiální proliferativní LN, III – fokální proliferativní LN, IV – difusní proliferativní LN, V – membranózní LN, VI – pokročilá sklerotizující LN (37; 48).

Diabetická nefropatie, velmi častý typ sekundární glomerulonefritidy, je klinický syndrom charakterizovaný perzistentní albuminurií (<300mg/24hod), jedná se o závažnou mikroangiopatickou komplikaci diabetu.

U pacientů s DM 1. a 2. typu se diabetická nefropatie vyvine u 25% pacientů. Histologicky nacházíme v počátku hypertrofii glomerulů a tubulů, expanzi mezangia, ztlustění GBM, hyalinizaci cévní stěny aferentních i eferentních arteriol, difuzní glomerulární lézi a fibrózu intersticia. V patogenezi se účastní chronická hyperglykémie (neenzymatická glykace bílkovin), hemodynamické změny (glomerulární hyperfiltrace), zvýšená syntéza a snížená degradace extracelulární matrix a genetické faktory. Klinický průběh diabetické nefropatie je od stádia I (hypertroficko-hyperfiltrační), přes II. (latentní), III. (incipientní) až do IV. stádia (manifestní) a V. (chronické selhání ledvin). Diabetická nefropatie je u dospělých jednou z nečastějších příčin nefrotické proteinurie (37; 49).

Diabetická nefropatie je tedy charakterizována zesílením glomerulární a tubulární bazální membrány, expanzí mesangiální extracelulární matrix, mikrovaskulárním poškozením a fibrotickými změnami v tubulointersticiu.

Mezi nejčastější renální komplikace esenciální hypertenze patří **benigní nefroskleróza**, u které funkční změny předchází rozvoji následného morfologického postižení (zesílení stěn a zužení lumina malých intrarenálních arterií a glomerulárních arteriol, segmentární nebo globální skleróza glomerulů, postižení tubulů a intersticia a zmenšení až atrofie ledvin). Albuminurie je přítomna u 40% hypertoniků. U benigní nefrosklerózy proteinurie většinou nepřesahuje 1g/den. K rozvoji terminálního selhání ledvin s nutností náhrady funkce ledvin dochází u 3% hypertoniků. Maligní nefroangioskleróza se vyskytuje u 1% hypertoniků, příčinou je těžká hypertenze, která vede k selhání renální autoregulace, histologickým nálezem je obliterující proliferativní endarteritida, typické jsou fibrinoidní nekrózy postihující aferentní arterioly a kapiláry glomerulu. Třetím typem postižení při esenciální hypertenzi je aterosklerotické postižení renálních tepen. Významná stenóza jedné renální tepny vede k sekundární renovaskulární hypertenzi (37; 50).

Morfologickými kritérii **amyloidózy** jsou extracelulární depozita bílkovinného materiálu – amyloidu (lineární, nevětvené agregované fibrily s pravidelnou konfigurací β -skládaného listu). Systémové amyloidózy se dělí na AA amyloidózu, kdy fibrilárním prekurzorem je SAA, tento typ komplikuje chronická zánětlivá onemocnění jako je např. revmatoidní artritida, Crohnova choroba, tuberkulóza atd. Druhým typem je AL amyloidóza, fibrilárním prekurzorem jsou lehké řetězce κ nebo λ , ta doprovází onemocnění spojené s tvorbou paraproteinu (mnohočetný myelom, MGUS, B-CLL, lymfomy). Typickým projevem při postižení ledvin je proteinurie, často nefrotická a pozvolná progresie do chronické renální insuficience. Další orgány, které u amyloidózy bývají postiženy jsou myokard, GIT, nadledviny, slezina, cévy a periferní nervy (37; 51).

Membranoproliferativní glomerulonefritida, nebo-li mezangiokapilární glomerulonefritida (MPGN) je klinicky charakterizována nefrotickým syndromem a histologicky různým stupněm zmnožení mezangia a jeho periferní expanzí podél stěny glomerulárních kapilár s postupnou redukcí průsvitu glomerulární kapiláry. Toto onemocnění je nejčastější příčinou nefrotického syndromu v rozvojových zemích v důsledku jeho vazby na chronické infekce (lepra, malárie, schistosomiáza, v našich podmínkách především HCV infekce, bakteriální endokarditida, abdominální abscesy). Z autoimunitních chorob je nejčastější asociace s esenciální smíšenou kryoglobulinemií a systémovým lupus erytematosus. Klinický obraz je pestrý od asymptomatické proteinurie a hematurie, nefrotický syndrom až po rychle progredující chronickou renální insuficienci (37; 52).

1.3. Podocyty

Funkční jednotkou ledvin je nefron, jehož úkolem je filtrovat plazmu s následnou tvorbou definitivní moči. Kapiláry glomerulu jsou vystlány endotelovými buňkami krytými bazální membránou, obklopenou podocyty, které tvoří viscerální vrstvu Bowmanova pouzdra. Na vaskulárním pólu Bowmanova pouzdra pak přechází ve vrstvu parietální. Prostor mezi viscerální a parietální vrstvou se nazývá Bowmanův prostor, který na výtokovém pólu pouzdra přechází plynule do proximálního tubulu (53).

Podocyty, také nazývané glomerulární viscerální epiteliální buňky, jsou terminálně diferencované granulační epiteliální, vysoce specializované buňky s jedinečnou lokalizací a architekturou. Jsou tvořeny buněčným tělem a mnohočetnými výběžky, kterými pokrývají zevní povrch bazální membrány glomerulárních kapilár. Výběžky s filtračními štěrbinami jsou velmi důležitou součástí podocytů. Tenká filtrační membrána („slit diaphragm“) zajišťuje funkci filtrační bariéry a umožňuje tak jednu z významných funkčních schopností ledvin. Hraje klíčovou úlohu v selektivitě dle velikosti a náboje glomerulární filtrační bariéry a zabraňuje vzniku proteinurie (54). Prekurzory podocytů se vyvíjejí z mesenchymální kmenové buňky, z prolifерujících prekurzorů metanefrického mezenchymu. Během glomerulárního vývoje získávají podocyty charakteristiku epiteliálních buněk. Tento vývoj je provázen i změnami v expresi mnoha proteinů. Od poloviny 90. let, kdy se objevily první zprávy o možnosti postižení podocytů u progredujícího chronického glomerulárního onemocnění (55), se podocyty staly jedním z hlavních objektů výzkumu v experimentální nefrologii.

1.3.1. Kultivace podocytů

Buněčné kultury dnes patří mezi jedny z nejčastějších biologických modelů používaných ve výzkumu. Ve srovnání s jinými experimentálními modely mají nesporné výhody, jako je možnost pracovat pouze s jedním typem buněk, ale samozřejmě i některá omezení vzhledem k tomu, že v tkáních mají obvykle buňky přirozené okolí, které jim v laboratoři chybí. Během jejich kultivace může docházet k dediferenciaci či změně fenotypu.

Práce s buněčnou linií má několik fází a to izolaci buněčného kmene, udržování buněčné linie, její expanze a poté využití namnožených buněk v pokusu.

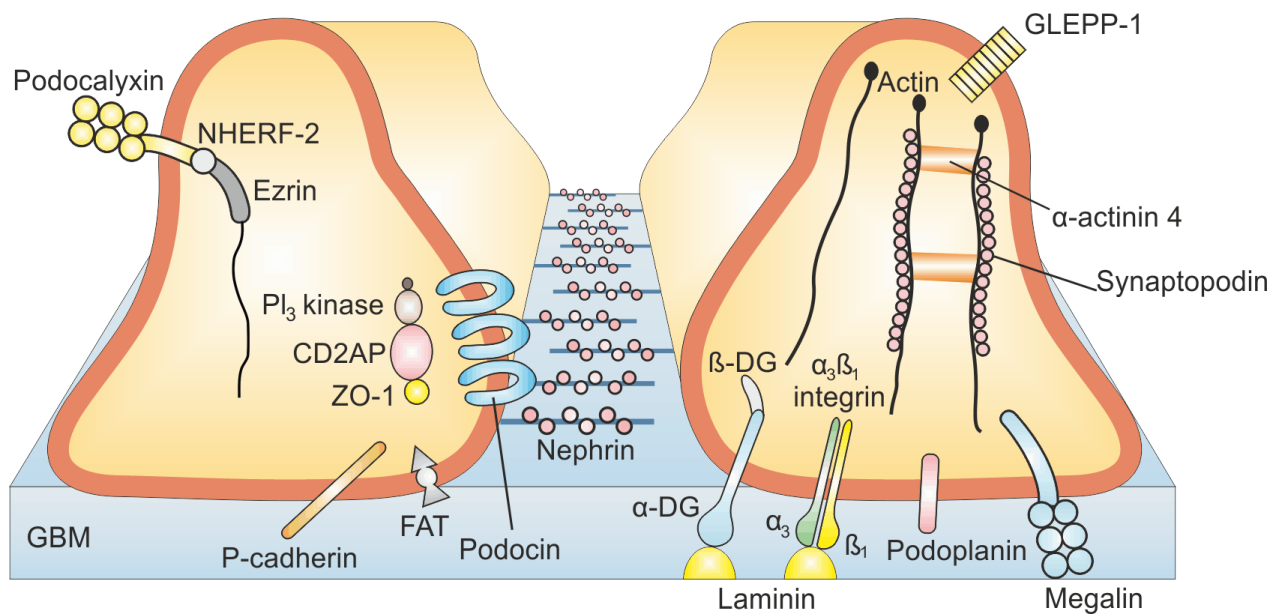
Jako první popsali izolaci a primární kultivaci renálních podocytů již v roce 1954 Krakower a Greenspon (56). Tato technika se rozšířila až v 70. a 80. letech a o něco později byla modifikována Burlingtonem a Cronkitem (57). Některé z těchto experimentálních technik jsou, i když ve změněné formě, užívány dodnes. V práci Kreisberga a spol. byly za aseptických podmínek dekapsulované potkaní kousky kortikální tkáně prosívány sérií nerezových sítok (tzv. „sieving method“) se zmenšující se velikostí pórů (250 a 150 μm), kdy se glomeruly zachytily na sítku o velikosti pórů 75 μm (58). Získané glomeruly byly poté pokládány přímo do kultivačních nádob, kde došlo k rozrůstání buněk nebo byly vystaveny enzymatické disociaci působením např. kolagenázy či 0,2% trypsinu (59). Izolované glomeruly bylo možné ve většině případů nasadit na komerčně vyráběný bovinní dermální kolagenovou matrix. Po kultivaci ve speciálním mediu došlo k rozrůstání kolonií glomerulárních epiteliálních buněk. Glomerulární epiteliální buňky (podocyty) vypadaly pod mikroskopem s fázovým kontrastem jako polygonální buňky a mohly být pasážovány tak dlouho, dokud proliferovaly.

Mundel a spol. (60) modifikovali kultivační podmínky tak, že diferenciaci podocytů byla ukončena v první subkultuře a v dalších pasážích již neprobíhala. Primární rozrůstání buněk bylo získáno v první pasáži z korových glomerulů pomocí sítka o velikosti pórů 25 μm a buňky dále diferencovaly na kolagenu typu 1. Během 2-3 týdnů se subkultivované „cobblestones“ (vzhledu „dlažebních kostek“) transformovaly do jednotlivých „arborizovaných buněk“. Původ podocytů byl potvrzen pozitivním barvením na WT-1, O-acetylovaný gangliosid, kromě toho u „arborizovaných“ buněk byl exprimován ještě synaptopodin, důležitý marker diferencovaných podocytů. Proces konverze nebyl závislý na většině kultivačních podmínek (typ kultivačního media, obsah séra nebo typ povrchu). Jediné co zpomalilo konverzi byla vysoká denzita buněk. Pozorovali tedy především konverzi „cobblestones“ (nediferencovaných a proliferujících podocytů) do „arborizovaných“ buněk, které jsou více podobné podocytům in vivo, i když se nejedná o terminálně diferencované buňky (neexprimují dostatečně podocalyxin a „51-kDa slit-membrane-associated protein“), což je hlavní důvod, proč se tato práce rozchází s pracemi Weinstein et al. (61) a Yaoity et al. (62).

Z nezralých fetálních ledvin je možné získat primární kultury humánních fetálních podocytů, které bývají zpravidla zdrojem imortalizovaných podocytárních buněčných linií. Většina terminálně diferencovaných buněk vykazuje pouze omezenou proliferační schopnost. Pouze tumorózní buňky nebo spontánně transformované imortalizované netumorózní buňky mohou umožnit vznik kontinuálních buněčných linií. K získání imortalizovaných buněk z různých tkání byla vyvinuta řada metod. Jedna z nich je založena na inzerci imortalizovaného genu kodujícího opičí virus 40 (SV 40) tzv. „large tumour antigen“ (TAg) do in vitro kultivovaných buněk transfekcí nebo retrovirovou infekcí. Alternativně jsou buňky pro kulturu izolovány z transgenních myší, které v sobě nesou SV 40 TAg imortalizovaný gen (63; 64). Upravené imortalizované geny jsou vloženy do kultivovaných buněk pouze k převedení z fáze proliferace do diferenciaci a následně je imortalizovaný gen nebo jeho produkt inaktivován. V mnoha buněčných liniích se užívá například SV 40 teplotně senzitivní mutující linie tsA58 kódovaná termolabilním TAg, která je schopna imortalizovat pouze při určité teplotě (65). Tato metoda však neodstraní hlavní problémy spojené s vytvořenými buněčnými liniemi transfekcí nebo infekcí. Další možností bylo užití transgenních myší nosících dvojité podmíněný imortalizovaný gen (66).

Vlastní identifikace kultivovaných buněk a potvrzení jejich fenotypu v dnešní době reprezentuje součást in vitro buněčných kultivačních technik. Původně bylo hlavní a jediné kritérium k identifikaci kultivovaných podocytárních buněk buněčná morfologie, kterou bylo možné sledovat pod fázovým mikroskopem. Je všeobecně akceptováno, že malé polygonální buňky podobající se „cobblestones“ jsou diferencující proliferující podocyty, zatímco dlouhé, větvcí se a často binukleární „arborizované“ buňky jsou zralé podocyty (60). Je třeba zmínit, že mnohé studie byly provedeny na nezralých podocytech. Tato identifikace však není jednoznačná. Při sledování těla primárně kultivovaných buněk a imortalizovaných buněčných linií záleží na různých variacích a sledovaná buněčná forma se může výrazně lišit od té, kterou pozorujeme in vivo. Morfologie je tedy pouze jedno z kritérií buněčné identifikace.

V běžné vědecké praxi jsou nejčastěji kultivované buňky identifikovány imunochemickou detekcí (imunochemie, imunofluorescence) proteinu, který by měl být exprimován výhradně podocyty. Výběr proteinu jako podocytárního markeru byl často měněn. Bylo zjištěno, že některé z těchto markerů nejsou specifické pro podocyty nebo je jejich exprese variabilní (Obr. 5).



Obrázek 5: Přehled proteinů podocyty; překresleno (37)

Poznámky k Obr.5 – NHERF-2 - Sodium/Hydrogen Exchanger Regulatory Protein 2,

PI₃ kinase - Phosphatidylinositol-3-Kinase, CD2AP- CD2-Associated Protein, ZO-1 - Zona Occludens

Proteins 1, GBM - Glomerular Basement Membrane, α-DG - α-Dystroglycan, β-DG- β-Dystroglycan,

GLEPP-1- Glomerular Epithelial Protein 1

1.3.2. Močové podocyty

Bylo zjištěno, že podocyty mohou být přítomny i v moči. Vogelmann a spol. byli první, kdo úspěšně kultivovali lidské močové buňky, které byly identifikovány jako podocyty (67). Všechny buňky byly viabilní a schopné růstu in vitro. Růstový model močových podocytů se zdá být podobný primárním buňkám migrujícím z explantovaných glomerulů nebo imortalizovaným humánním podocytárním liniím. Během několika dnů se objevily kolonie tvořené buňkami typu „cobblestones“. Po 1-2 týdnech růstu byla většina buněk apoptotických, zatímco zbylé buňky diferencovaly. Močové buňky pacientů s aktivním glomerulárním onemocněním vykazovaly rychlou proliferaci, zatímco ostatní vyvinuly výběžky. Po několika trypsinizacích a replantaci, se opět rozrůstaly do konfluentní vrstvy, značící vysoký proliferační potenciál. Močové kultury zdravých osob a pacientů s inaktivní glomerulopatií vykazovaly menší buněčné kolonie a replantaci nepřežily. Bylo zvažováno, zda podocyty zdravých kontrol a pacientů s inaktivní glomerulopatií, na rozdíl od pacientů s aktivní glomerulopatií, nestárnou rychleji, což má za následek limitovaný proliferační potenciál.

Z dalších studií in vivo bylo prokázáno, že podocyty při aktivním glomerulárním onemocnění dediferencují jako odpověď na intraglomerulární poškozující faktory, které vedou k vyšší proliferační schopnosti. Po identifikaci kultivovaných buněk bylo zjištěno, že tyto buňky exprimují některé pro podocyty specifické markery jako podocalyxin, podocin, synaptopodin a P-cadherin. Avšak v jádru lokalizovaný univerzální podocytární marker WT-1 měl tendenci vymizet během několika týdnů. Některé buňky pozitivní pro podocytární markery (WT-1 a podocin) a koexprimované markery dalších buněčných typů jako je cytokeratin-8 (tubulární epiteliální buňky) nebo „ α -smooth muscle actin“ (myofibroblasty, mesangiální buňky) mohou skutečně naznačovat dediferenciaci a/nebo transdiferenciaci kultivovaných podocytů (67). Detekci podocytů v moči se zabývala i práce Mundela (68).

V močovém sedimentu některých pacientů s onemocněním ledvin byly detekovány elementy pozitivní pro C3b komplement receptor 1 a podocalyxin (povrchový sialoglykoprotein podocytů) (69; 70). Podocalyxin (PCX) je transmembránový glykoprotein patřící do rodiny CD34 povrchových molekul, který se za fyziologických podmínek nachází i na povrchu řady dalších buněk (např. trombocytů, monocytů, prekursorů hematopoetických buněk). Za jeho hlavní funkci se považuje prevence adheze typu buňka - buňka, buňka - matrix.

Za fyziologických podmínek je podocalyxin nejdůležitějším faktorem pro udržení filtračních štěrbin mezi pedikly. Jeho nadměrná exprese (např. při zvýšené tvorbě CIK, aktivaci složek komplementu) na povrchu podocytů vede k poškození těsných mezibuněčných spojení typu „tight-junction“ a tím ke zvýšené propustnosti filtrační membrány. Přítomnost podocalyxin pozitivních buněk v moči byla prokázána u celé řady experimentálních i humánních glomerulárních onemocnění (71). To vedlo ke vzniku myšlenky, že při glomerulopatiích s postižením podocytů dochází k odloupenutí („detachment“) podocytů z glomerulární bazální membrány a jejich odchodu do moči. Nebyl však dostatek jednoznačných důkazů, že podocalyxin pozitivní buňky tvořily skutečně podocyty. Kromě toho nebyla testována viabilita těchto buněk.

2. Hypotézy a cíle práce

2.1. Klinicko-laboratorní studie

2.1.1. AGEs u nefropatií s mírnou renální insuficiencí

Sledování markerů oxidačního stresu, se zaměřením na AGEs, u pacientů s onemocněním ledvin. Hledání vztahu sérových hladin AGEs k typu nefropatie a funkci ledvin.

2.1.2. Asociace AGEs s nutričními parametry a anémií u pacientů s chronickým onemocněním ledvin

Sledování sérových hladin AGEs u pacientů s chronickým onemocněním ledvin v souvislosti s nutricí, anémií a mikrozánětem.

2.1.3. Vliv funkce ledvin na hladiny sRAGE u pacientů s chronickým onemocněním ledvin

Sledování vlivu funkce ledvin na sérové hladiny sRAGE u pacientů s chronickým onemocněním ledvin.

2.2. Experimentální studie

2.2.1. Kultivace podocytů

Sjednocení technik vhodných ke kultivaci podocytů užívaných jak v minulosti tak v současnosti se zaměřením na nejčastěji užívané metody. Zavedení a osvojení si nejvhodnější metody kultivace nejen primokultur, ale i imortalizovaných podocytů v našich podmínkách.

2.2.2. Detekce podocytů v moči u pacientů s onemocněním ledvin

Nalezení praktické a rychlé metody stanovování podocytů v moči a sledování vztahu podocyturie s proteinurií a aktivitou onemocnění.

3. Materiál a metodika

3.1. Pacienti a kontroly, odběr vzorků krve a moči

3.1.1. AGEs u nefropatií s mírnou renální insuficiencí

Vyšetřili jsme celkem 60 pacientů se čtyřmi typy nefropatií. 18 pacientů s lupusovou nefritidou (3 muže a 15 žen, střední věk 30 ± 5 let), 17 pacientů s IgA nefropatií (10 mužů a 7 žen, střední věk 34 ± 14 let), 16 pacientů s membranózní nefropatií (8 mužů a 8 žen, střední věk 58 ± 15 let) a 9 pacientů s ANCA asociovanou vaskulitidou (4 muži a 5 žen, střední věk 49 ± 14 let). Všichni pacienti měli sérové hladiny kreatininu nižší než $200 \mu\text{mol/l}$, byli vyšetřeni v klinicky stabilizovaném stavu (bez známek infekce) a neužívali žádné antioxidační léky. V kontrolní skupině bylo 15 jedinců s nepřítomným onemocněním ledvin a s normální renální funkcí (6 mužů a 9 žen, střední věk 44 ± 11 let). Před vyšetřením pacienti i zdravé kontroly podepsali informovaný souhlas. Studie byla schválena lokální etickou komisí.

Vzorky krve byly odebírány venepunkcí. Krev byla do 1 hodiny po odběru centrifugována při 3000 ot./min, teplotě 4°C , po dobu 10 minut a sérum bylo zamraženo na -80°C . Analýza vzorků byla provedena do šesti měsíců po odběru.

3.1.2. Asociace AGEs s nutričními parametry a anémií u pacientů s chronickým onemocněním ledvin

Na našem pracovišti bylo vyšetřeno 159 pacientů s různým stupněm renální insuficience a jako kontrolní skupina 44 zdravých jedinců. Všichni vyšetření podepsali informovaný souhlas. Studie byla schválena lokální etickou komisí. Klinické, demografické a biochemické údaje jednotlivých skupin jsou zahrnuty v Tabulce 1. Etiologie chronického onemocnění ledvin byla následující: ANCA asociovaná vaskulitida (20%), hypertenzní nefropatie (8%), lupusová nefritida (14%), IgA nefropatie (21%), diabetická nefropatie (4%), membranózní nefropatie (15%), fokálně segmentární glomeruloskleróza nebo minimální změny (11%), amyloidóza (5%) a ostatní (1%). Pacienti byli rozděleni do pěti skupin dle výše glomerulární filtrace - eGFR (MDRD), dle hodnocení K/DOQI: stádium 5 (eGFR < 15 ml/min), stádium 4 (eGFR 15-30 ml/min), stádium 3 (30-60 ml/min). Pacienti ve stádiu 1 a 2 byli spojeni do jedné skupiny (eGFR > 60 ml/min).

Z lékařské dokumentace jednotlivých pacientů byla zjištěna anamnéza kardiovaskulárního onemocnění, zahrnující ischemickou chorobu srdeční (ICHS), ischemickou chorobu dolních končetin (ICHDK) a/nebo cerebrovaskulární onemocnění. Většina pacientů užívala medikaci, která je běžná při chronické renální insuficienci jako jsou diuretika, antiagregancia, kalcium a vitamin D, statiny či antihypertenziva.

Vzorky krve pro stanovení AGEs a rutinní vyšetření byly pacientům a kontrolní skupině odebírány punkcí kubitální žíly. Odběry krve byly prováděny u pacientů na lačno. Všechny vzorky krve byly centrifugovány po dobu 10 minut při 1450 ot./min, teplotě 4°C. Sérum bylo uchováváno při teplotě - 80 °C.

Tabulka 1: Klinická, demografická a laboratorní charakteristika studijní skupiny a kontrol

	Kontroly	CKD 1-5	CKD 1+2	CKD 3	CKD 4	CKD 5	P:Anova CKD 1-5
Počet pacientů	44	159	71	42	31	15	
Věk (roky)	57±10	49±17	40±15	54±16	59±12	58±11	p<0,001
M/Ž %	36/64	52/47	58/42	36/64	61/39	53/47	
Kouření	29	13	16	9	13	7	n.s.
BMI (kg/m ²)	25,5±3,5	26,8±4,4	25,8±4,2	26,9±4,4	28,7±4,8	27,6±3,9	p=0,02
Hypertenze %	0	73	58	81	87	100	p=0,0003
KV onem. %	0	19	3	24	42	40	p<0,0001
DM %	0	14	1	21	29	27	p= 0,0004
MDRD (ml/s)	1,2±0,2	0,9±0,6	1,4±0,4	0,7±0,2	0,4±0,1	0,2±0,03	p<0,0001
Proteinurie (g/24h)	0,22±0,04	3,30±5,2	2,60±3,2	3,00±4,0	5,70±9,3	2,9 ±3,0	p<0,05
Kreatinin (umol/l)	86±12	160±110	85±19	135±27	256±64	429±87	p<0,0001
KM(μmol/l)	271±61	360±100	330±100	380±100	401±97	400±110	p=0,02
ALT (μkat/l)	0,41±0,28	0,42±0,35	0,47±0,45	0,39±0,29	0,37±0,17	0,39±0,24	n.s.
Albumin (g/l)	43,7±2,4	31,9±8,0	32,3±8,8	31,8±8,0	31,0±7,6	31,8±5,4	n.s.
Prealbumin (g/l)	0,27±0,02	0,27±0,08	0,26±0,07	0,26±0,08	0,29±0,10	0,29 ±0,08	n.s.
CRP (mg/l)	3,3±2,0	6,4±7,9	4,8±4,7	7,0±11,0	7,6±7,2	7,9 ±9,3	n.s.
Orosomukoid (g/l)	0,78±0,19	1,10±0,50	0,91±0,43	1,25±0,56	1,24±0,44	1,33 ±0,44	p< 0,0001
Chol. (mmol/l)	5,43±0,85	5,9±2,2	6,0±2,1	5,9±2,2	5,8±2,2	5,0±2,3	n.s.
Fibrinogen (g/l)	3,3±0,5	4,3±1,0	4,3±0,9	4,3±1,3	4,5±0,97	4,52±0,82	n.s.
Hb (g/l)	141±10	118±20	131±17	113±19	103±13	101±9	p< 0,0001
Leukocyty (10 ⁹)	6,3±1,8	7,7±2,9	7,4±2,4	8,2±3,5	8,0±3,1	6,7±2,5	n.s.
AGEs (AU)	3,2±0,48x10 ⁵	3,9±1,7x10 ⁵	3,0±1,0x10 ⁵	3,7±1,4x10 ⁵	5,3±1,9x10 ⁵	6,0±1,7x10 ⁵	p< 0,0001

Poznámky k Tab. 1: Data jsou vyjádřena jako průměr ±směrodatná odchylka

Zkratky: AGEs – Advanced Glycation End Products, ALT – Alaninaminotransferáza, AU – Arbitrary Units, BMI – Body Mass Index, CRP – C-reaktivní protein, CKD – Chronic Kidney Disease-chronické onemocnění ledvin, DM – Diabetes Mellitus, Hb – hemoglobin, Chol. – cholesterol, KM – kyselina močová, Ž – ženy, M – muži, MDRD – Modification of Diet in Renal Disease, KV onemocnění – anamnéza kardiovaskulárního onemocnění

Referenční hodnoty: Kreatinin 44,2 – 109,6 μmol/l; Albumin 35 - 53 g/l; Prealbumin 0,20 – 0,40 g/l; CRP < 7 mg/l; Orosomukoid 0,50 – 1,20 g/l; Cholesterol 3,83 – 5,80 mmol/l; Fibrinogen 2 - 4 g/l; Hemoglobin 135 - 174 g/l

3.1.3. Vliv funkce ledvin na hladiny sRAGE u pacientů s chronickým onemocněním ledvin

Podrobná charakteristika pacientů s chronickým onemocněním ledvin, s různým stupněm renální insuficience a kontrol je v Tabulce 2. Všichni pacienti byli v době studie klinicky stabilizováni, bez přítomnosti akutní infekce či akutní kardiální příhody. Skupina pacientů s chronickým onemocněním ledvin, bez nutnosti náhrady funkce ledvin, čítala 25 pacientů. U osmi pacientů byla stanovena diagnóza IgA nefropatie, u pěti ANCA asociovaná vaskulitida, u dvou hypertenzní nefropatie, u dvou diabetická nefropatie, u dvou kombinace hypertenzní nefropatie a diabetické nefropatie, u dvou kombinace hypertenzní nefropatie a chronické tubulointersticiální nefritidy, u tří membranózní nefropatie a u jednoho pacienta polycystická choroba ledvin. Tři z těchto pacientů byli léčeni kortikosteroidy, čtyři kombinací kortikosteroidů a cyklofosfamidu a dva pacienti kombinací kortikosteroidů a chlorambucilu. Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 21 zdravých jedinců (9 mužů, 12 žen, střední věk 59 ± 7 let). V době studie pacienti neužívali žádné speciální potravinové přídavky. Studie byla schválena lokální etickou komisí a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas před vstupem do studie.

U pacientů a kontrolní skupiny byla krev odebírána po nočním lačnění punkcí kubitální vény, současně s krevními vzorky na běžné laboratorní vyšetření. Krev byla po dobu 10 minut centrifugována při 1450 ot./min a sérum bylo zamraženo na -80°C . U pacientů s renální insuficiencí, byla současně sbírána moč za 24 hodin. Vyšetření všech vzorků bylo provedeno během šesti měsíců po odběru.

Tabulka 2: Charakteristika pacientů s chronickým onemocněním ledvin a zdravých kontrol

	Pacienti s chronickým onemocněním ledvin	Zdravé kontroly
Počet pacientů (muži/ženy)	25 (12/13)	21 (9/12)
Věk (roky)	54±12	59±7
Trvání renálního onemocnění či dialýzy	1 měsíc – 12 let	0
Základní charakteristiky	S-krea 61,88-468,52 μmol/l Cl.kr. 0,37-3,29 ml/s/1,73m ² Proteinurie 0,06-6,3 g/24hod (medián 1,23g/24hod)	S-krea <106,08 μmol/l Cl.kr. >1,50 ml/s/1,73m ² Proteinurie < 0,1g/24hod
Hypertenze	19	0
Ischemická choroba srdeční	3	0
Diabetes mellitus	5	0
Dyslipidemie	10	0
Body mass index (kg/m²)	26,2±3,7	24,9±2,9
Albumin (g/l)	34,0 (30,0-35,0)	43,0 (40,1-44,5)
Hemoglobin (g/l)	111 (100-116)	137 (135-150)
Hematokrit (%)	34,0 (30,0-35,0)	40,8 (40,1-44,5)

Poznámky k Tab. 2: Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka, medián a kvantilová rozpětí

Zkratky: S-krea – sérový kreatinin, Cl.kr. – clearance kreatininu

3.2. Stanovení laboratorních parametrů

3.2.1. AGEs

Při vyšetření hladin fluoreskujících AGEs jsme vycházeli z fluorescenčního stanovení podle Henleho (72) a Muncha (73).

Fluorimetrické metody jsou založeny na principu průchodu záření přes měřený vzorek, čímž dochází k excitaci na vyšší energetickou hladinu a následnému vyzáření energie ve formě fluorescenčního záření. Intenzita fluorescence je měřena pomocí přístroje spektrofluorimetru, který je vybavený optickými mřížkami a umožňuje nastavení excitační a emisní vlnové délky.

Spektrofluorimetry měří signál vzorku umístěného obvykle v kyvetě, možné i na destičce. Ze záření vysílaného intenzivním excitačním zdrojem je monochromátorem izolováno záření těch vlnových délek, které chceme použít pro excitaci vzorku. Toto záření dopadá na vzorek a excituje v něm fluorescenční záření, které vystupuje ze vzorku všemi směry. Pouze jeho část vystupuje v takovém směru, že prochází přes sekundární (emisní) filtr nebo monochromátor a dopadá na fotoelektrický detektor. Dochází k vyvolání elektrického signálu, který se dále zesiluje a měří. Jeho velikost je mírou fluorescenčního zářivého toku vysílaného vzorkem na vlnových délkách izolovaných emisním filtrem (monochromátorem). Podmínky buzení jsou přitom určeny zdrojem excitačního záření a primárním filtrem (nastavením excitačního monochromátoru). Pokud je přístroj v excitačním optickém systému vybaven excitačním monochromátorem, můžeme plynule měnit vlnovou délku, na kterou je tento monochromátor nastaven a zaznamenat excitační spektrum vzorku. Pokud je přístroj vybaven monochromátorem v emisním optickém systému, můžeme plynule měnit vlnovou délku, na kterou je nastaven tento monochromátor a zaznamenat emisní spektrum vzorku (74).

Reagencie:

- hydrogenfosforečnan sodný p.a.
- dihydrogenfosforečnan sodný p.a.
- chlorid sodný p.a.
- fosfátový pufr 0,01 M, obsahující 0,1 M chlorid sodný; pH 7,4

Krevní sérum bylo zředěno v poměru 1:50 s fosfátovým pufrům při pH 7,4, promícháno na vortexu (15 s) a poté byla změřena fluorescence.

Při měření jsme použili spektrofluorometr – Fluoromax-3, Jobin Yvon Horiba, USA. Součástí tohoto typu přístroje je klasicky xenonová oblouková lampa, dále excitační a emisní monochromátory před a za vzorkem. Pomocí mřížek jednotlivých monochromátorů je dosažena požadovaná vlnová délka. Další součástí je fotonásobič pro detekci a referenční fotodiody ke korekci kolísání emise xenonové lampy. Spektrofluorimetr je připojený a řízený softwarem DataMax, programem, který zajišťuje získání dat a jejich analýzu (www.biocompare.com). Bylo měřeno emisní spektrum 375-515 nm při excitaci 350nm a stanovena fluorescenční intenzita v emisním maximu ~ 435 nm. Intenzita fluorescence je vyjádřena v arbitrárních jednotkách (arbitrary units AU) (75).

3.2.2. sRAGE

Solubilní formu RAGE (sRAGE) jsme analyzovali pomocí nekompetitivní sandwich ELISA metody (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Pomocí této metody jsme stanovovali koncentraci solubilního RAGE ve vzorcích séra. Na povrchu jamek mikrotitračních stripů s navázanou specifickou protilátkou proti RAGE (extracelulární komponenta) dochází po přidání vzorků do jamek k navázání RAGE na imobilizovanou protilátku. Po promytí nenavázaných složek vzorku jsou imunokomplexy detekovány konjugátem, tedy polyklonální protilátkou proti RAGE značenou enzymem. Vzniká tzv. „sendvič“, který je tvořen protilátkou ve stěně stripu, antigenem RAGE a druhou protilátkou (konjugátem). Množství navázaných značených protilátek je zviditelněno enzymovou reakcí. Po promytí je přidán substrát, který je pomocí peroxidasy přeměněn na barevný produkt dle přesného množství RAGE navázaného v prvním kroku. Enzymová reakce je zastavena přidáním zastavovacího roztoku (slabá kyselina) a následně dochází ke zbarvení různé intenzity dle množství přítomných protilátek. Intenzita zbarvení je změřena pomocí spektrofotometru při vlnové délce 450/570 nm.

V naší práci byl použit kit, který jsme zpracovali dle návodu výrobce (Quantikine; RD Systems, Minneapolis, MN, www.rndsystems.com).

Materiál a reagencie:

- Kit Human RAGE – deska obsahující 96 jamek potažených myší monoklonální protilátkou proti RAGE
- RAGE konjugát – 21ml/balení – polyklonální protilátka proti RAGE konjugovaná s křenovou peroxidázou v konzervačním roztoku
- RAGE standard – 50ng/balení – rekombinační humánní RAGE/Fc chiméra v konzervačním roztoku, lyofilizovaná
- Ředící roztok RD1-60 – 11ml/balení – proteinová база s konzervačním roztokem a modrým barvivem
- Ředící roztok pro kalibrátor RD6-10 – 21ml/balení – proteinová база s konzervačním roztokem

- Promývací roztok – 21ml/balení – koncentrovaný roztok s detergentem, obsahující konzervační roztok
- Barvivo A – 12 ml/balení – stabilní hydroperoxid
- Barvivo B – 12ml/balení – stabilní chromogen (tetramethylbenzidin)
- Zastavovací roztok – 6ml/balení – 2N kyselina sírová
- Krycí fólie

Před zahájením analýzy jsme všechny reagensie a vzorky ponechali při pokojové teplotě.

Do každé jamky jsme aplikovali 100ul ředícího roztoku, poté 50ul standardů pro kalibrační křivku (koncentrace 5000 pg/ml, 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 313 pg/ml, 156 pg/ml, 78 pg/ml, 0 pg/ml) nebo 50ul kontrol nebo vzorků séra. Následovala inkubace při pokojové teplotě po dobu dvou hodin. Poté jsme jamky celkem 4x promyli promývacím roztokem, přidali 200ul RAGE konjugátu do každé jamky a opět ponechali inkubovat po dobu dvou hodin. Po čtyřnásobném proplachu bylo přidáno do každé jamky 200 ul substrátu a následovala 30 minutová inkubace při pokojové teplotě, s omezením přístupu světla. Poté jsme přidali 50 ul zastavovacího roztoku do každé jamky, následně došlo ke změně zbarvení z modré na žlutou. Po 30 minutách jsme výsledky měřili při vlnové délce 450 a referenční vlnové délce 570 nm pomocí spektrofotometru (Lab systems, Multiscan, Finland). Koncentrace sRAGE ve vzorcích byly odečítány z kalibrační křivky pomocí softwaru „Genesis“. Minimální detekční dávka sRAGE byla 4,12 pg/ml. Koncentrace RAGE byly dány v pikogramech na mililitr (pg/ml).

3.2.3. Další parametry

Běžné biochemické parametry byly stanoveny standardními klinicko - biochemickými metodami užitím automatizovaných analyzátorů.

Odhadovaná glomerulární filtrace byla počítána užitím vzorce Modification of Diet in Renal Disease (MDRD), který byl v tehdejší době doporučován (76).

3.3. Použité statistické analýzy

V práci AGEs u nefropatií s mírnou renální insuficiencí jsou výsledky vyjádřeny jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka. K vyhodnocení rozdílů mezi skupinami byla použita metoda ANOVA (analýza variace). K popisu vztahů mezi parametry byl použit korelační koeficient r . Výsledky byly hodnoceny jako statisticky významné při $p < 0,05$.

Při zjišťování vztahů mezi AGEs, nutričními parametry a anémií u pacientů s chronickým onemocněním ledvin byl použit software Statistics Toolbox™ MATLAB® (The MathWorks™, Inc.). Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka spojité veličiny a percentuálně pro kategorické proměnné. Srovnání mezi skupinami bylo provedeno pomocí nepárových t -testů a ANOVA pro spojité proměnné s normálním rozdělením. Mann-Whitneyovým U testem a Kruskal-Wallisovou ANOVA metodou pro proměnné s jinými rozdělovacími funkcemi. Pokud testy normality proměnných ukazovaly na logaritmicko normální rozdělení, byly tyto proměnné před zpracováním zlogaritmovány. Vztah mezi analyzovanými parametry byl stanoven pomocí Spearmanova nebo Pearsonova korelačního koeficientu. Všechny výsledky byly hodnoceny jako statisticky významné při $p < 0,05$. Parametry ovlivňující sérové hladiny AGEs jako nezávislé proměnné jsme hodnotili také pomocí vícenásobné (multivariantní) regresní analýzy.

V práci vlivu funkce ledvin na hladiny sRAGE u chronických onemocnění ledvin jsou výsledky vyjádřeny jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka a v případě vysoké interindividuální variability, jako medián a kvantilové rozpětí. K vyhodnocení rozdílů mezi skupinami byl použit Mannův-Whitneyův test a t -test. Vztahy mezi parametry byly stanoveny užitím Pearsonových a Spearmanových korelačních koeficientů. Všechny výsledky jsou brány jako statisticky významné, je-li $p < 0,05$.

3.4. Kultivace podocytů

3.4.1. Příprava primokultur a pasážování

S buněčnými kulturami je nutné pracovat ve speciální laboratoři s potřebným vybavením, kde je možné udržovat sterilitu a zabránit kontaminaci. Mezi základní pomůcky patří laminární box, inkubátor s řízenou atmosférou (zvýšený parciální tlak oxidu uhličitého, vysoká relativní vlhkost) a inverzní mikroskop vybavený fázovým kontrastem. Používá se sterilní jednorázový plast, kultivační nádoby s upraveným povrchem a chemikálie určené pro práci s buněčnými kulturami. Kultivační média jsou většinou směsí mnoha látek (anorganické ionty, zdroj energie, pufrující složka, aminokyseliny a také vitaminy a růstové faktory). Jako zdroj růstových faktorů, stopových prvků a dalších látek nutných pro růst kultury se používá krevní sérum, nejčastěji fetální bovinní.

Reagencie:

- HBSS - Hank's Balanced Salt Solution (Gibco – Life Technologies)
- Penicilin, Streptomycin, hydrogenuhličitan sodný, fibronectin z bovinní plazmy, kolagen typu I (C7661) z potkaních ocasů, kyselina octooctová, RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute, trypsin, INF γ - interferon γ (Sigma Aldrich)
- FBS - Fetal Bovine Serum (PAN Biotech)
- ITS - Insulin Transferin Selenium, PBS - Phosphate Buffered Saline (Gibco – Life Technologies)

Izolace glomerulů ledvin potkana kmene Wistar (samci, 150-170g, stáří 8 až 9 týdnů) byla schválena Komisí pro práci s laboratorními zvířaty na 1. LF UK v Praze. Aplikovali jsme postup dle Mundela a spol. (60) s několika modifikacemi.

Prvním krokem byla příprava roztoku HBSS s přidáním antibiotik - penicilinu 100 U/ml a streptomycinu 0,1mg/ml, hydrogenuhličitanu sodného (0,1763g na 500ml roztoku) a následovala úprava pH roztoku na hodnotu 7,3. Dalším krokem bylo rozlití fibronectinu do kultivačních lahví v množství 6ml na 25 cm², který jsme zde ponechali po dobu 24 hodin a druhý den přebytek odsáli. Poté byly kultivační lahve ponechány po dobu 3-5 hodin vlivu UV záření.

Důležitým krokem byla sterilizace a příprava nástrojů, odkládacího stolku, dezinfekce, dalších pomůcek a příprava speciálního boxu pro práci s buněčnými kulturami.

Část roztoku HBSS s antibiotiky byla použita na proplach cévního systému potkanů a další část na proplach získaných ledvin. Získaná ledvina potkana kmene Wistar byla asepticky podélně rozříznuta a pomocí nůžek oddělena kůra od dřene, za soustavného oplachování roztokem HBSS, ohřátém na teplotu 37°C. Kůru jsme špičkami nůžek dezintegrovali na kousky velké cca 1mm³ a umístili do falkony již obsahující roztok HBSS s antibiotiky. Následně jsme kortikální část ledviny prosívali sérií sítok (tzv. „sieving method“). Po upevnění sítka o velikosti pórů 250 µm jsme obsah falkony s kousky kůry ledvin vylili na sítko, pod nímž byla umístěna kádinka, kousky byly následně propasírovávány tloučkem směrem k centru sítka za soustavného oplachování roztokem HBSS. Sítkem v této fázi prochází i glomeruly, které jsou poté přítomny v kádince. Tento obsah jsme stejným způsobem prosívali dalším sítkem o velikosti pórů 150 µm a následně sítkem s póry o velikosti 75µm, na němž by se již měly zachytit především glomeruly. Sítko jsme pečlivě oplachovali, získané glomeruly promíchávali s roztokem HBSS s antibiotiky a rovnoměrně rozlévali do falkon (cca 25-40 ml). Po uzavření jsme falkonu centrifugovali při 1500 ot./min, při teplotě 20-25°C, po dobu 20 minut. Poté jsme roztok odsáli a centrifugát pomocí 5ml pipety resuspendovali s potřebným množstvím kultivačního roztoku, v našem případě RPMI 1640 s 10% FBS a 1% ITS, do kultivační láhve (malá v množství 4-5 ml, velká 7-8 ml) na již připravený fibronectin. Misky jsme následně umístili do Petriho misek a do termostatu, kde byly ponechány po dobu 48 hodin při teplotě 37°C, v atmosféře se zvýšeným parciálním tlakem oxidu uhličitého (5%). Již po dvou dnech kultivace jsme pod mikroskopem pozorovali vrstvu buněk („monolayer“).

Pasážování jsme prováděli krátce před dosažením konfluence. Používali jsme stejné roztoky HBSS a RPMI 1640, ale již bez přidání antibiotik. Nejprve jsme z kultivačních lahví odsáli kultivační medium a přidali roztok HBSS (2ml na misku), který jsme ponechali cca 1 minutu a odsáli, totéž bylo ještě jednou opakováno. Po odsátí HBSS jsme uvolňovali buňky enzymatickou disociací, a to přidáním trypsinu 0,05%, který byl ponechán cca 30-60 sekund. Po pouze částečném odsátí trypsinu jsme potencovali uvolnění buněk mechanicky, tím, že jsme otloukali kultivační lahev o stůl. K zastavení působení trypsinu jsme přidali roztok RPMI 1640 s 10% FBS a kultivační lahev jsme ještě pětkrát propláchli. Poté jsme obsah kultivační nádoby přemístili do falkony a centrifugovali po dobu 10 minut rychlostí 1500 ot./min. Vzniklý supernatant jsme odsáli k sedimentu buněk, k níž jsme následně přidali roztok RPMI 1640.

Po důkladném opláchnutí stěn falkony jsme cca 5ml naředěné buněčné sedliny nasadili do nové kultivační nádoby většinou o hustotě buněk $7-8 \times 10^3$ na cm^2 , která byla potažena kolagenem typu I při první pasáži.

Tyto potažené kultivační láhve si bylo nutné připravit 24 hodin před použitím, sterilizovat pomocí UV záření po dobu 30ti minut. Kolagen typu I byl rozpuštěn v 0,02 mol/l kyselině acetoctové a do kultivačních lahví dán v množství cca $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a ponechán při teplotě 4°C .

Při dalších pasážích jsme buňky pokládali na kolagen typu I či na plastický povrch. Následně jsme pozorovali novou kulturu nebo-li subkulturu (pasáž). Výměnu kultivačního média jsme prováděli 3x týdně. Před každým dalším pasážováním jsme buňky sledovali pod mikroskopem. Buňky jsme počítali pod světelným mikroskopem pomocí kalibrované komůrky (Bürkerovy komůrky), kde na jednom mikroskopickém sklíčku jsou vybroušená dvě pole hluboká 0,1mm, na jejichž dně je síťovitý obrazec. K odlišení živých a mrtvých buněk jsme používali roztok trypanové modři, který se u mrtvých buněk vzhledem k porušení integrity buněčné membrány a jejich transportních mechanismů, rychle dostal do buněk a obarvil buněčná jádra na modro.

Kolegové z mnichovského pracoviště nám věnovali imortalizované humánní podocyty „wild types“ z Heidelbergu – h63. Tyto podocyty byly pěstovány také v roztoku RPMI 1640 s 10% FBS a 1% PBS. Výměna média byla prováděna třikrát týdně, pasážování jsme prováděli stejně jako u buněk získaných z ledvin potkana. Podobně jako u potkaních buněčných linií se buňky rozmnožovaly při teplotě 33°C , byla zde však nutná přítomnost interferonu γ ($\text{INF}\gamma$) 100ul na 10ml média a jejich diferenciaci byla indukována držením na kolagenu typu IV při teplotě 37°C , bez přítomnosti $\text{INF}\gamma$.

3.4.2. Imunocytochemické stanovení podocytárních markerů

Reagencie:

- PFA – Paraformaldehyd, Triton X-100, NaN₃ - azid sodný, BSA – Bovine Serum Albumin, Rabbit anti Synaptopodin (RS-18, SE-19) (Sigma Aldrich)
- FBS – Fetal Bovine Serum (PAN Biotech)
- PBS - Phosphate Buffered Saline (Gibco – Life Technologies)
- Rabbit anti WT-1 (C-19) (Santa Cruz Biotechnology)
- Alexa Fluor® 488- conjugated anti-rabbit IgG (A11070) (Molecular Probes - Life Technologies)
- Vectashield® s nukleárním kontrastním barvivem DAPI (4',6 Diamidino-2-Phenylindole) (Vector Laboratories)

Po dosažení konfluency buněk, většinou po cca 3-7 ti dnech kultivace, jsme buňky připravili k imunocytochemickému vyšetření.

Před provedením imunocytochemie jsme při pasážování ponechali buňky v jamkách. Po odsátí média a neadherovaných buněk z jamek jsme adherované buňky fixovali ve fixačním roztoku (2% paraformaldehyd - PFA, 4% sacharóza v roztoku PBS), 2ml na jamku po dobu pěti minut, poté jsme odsáli PFA a přidali 2ml 0,3% Tritonu X-100 (permeabilizační pufr) v PBS na 10 minut. Po odsátí Tritonu jsme jamku jednou propláchli PBS a poté opět 1-2x po dobu 3minut. Uskladnění probíhalo ve skladovacím pufru (0,05% roztok NaN₃ s PBS). Takto mohly být buňky skladovány při 4°C přibližně 2 týdny.

K další práci jsme si připravili větší krabici s možností uzavření, kam jsme na dno položili mokrou buničinu a navrstvili parafilmem rozděleným na políčka pro krycí sklíčka. Následně jsme nanесли blokovací činidlo (na 10ml celkového objemu - 2% FCS 200ul, 2% BSA 200mg, 0,2% rybí želatina - doplněno PBS) na dobu 30 minut, poté jsme blokovací činidlo odstranili a vysušili okraj buničinou. Primární protilátku jsme naředili v blokovacím činidle z počátku v různých poměrech, abychom zjistili, jaký poměr je nejvhodnější. Zkoušeli jsme několik primárních protilátek, ale zaměřili jsme se především na anti WT-1 a anti synaptopodin. Protilátku jsme přidali v množství 50μl na krycí sklíčko a ponechali působit po dobu 60-120 minut. Poté jsme odstranili blokovací činidlo s primární protilátkou, jednou propláchli PBS a promývali 3x3 minuty a v mezidobí jsme přikrývali krabici víkem.

Následovalo přidání sekundární protilátky (Alexa Fluor® 488- konjugovaná králičí protilátka IgG) naředěné v blokovacím roztoku opět v různých poměrech (1:200, 1:50) po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě. Tato fáze byla prováděna se zamezením přístupu světla. Po odstranění sekundární protilátky jsme opět jednou propláchli PBS a promyli 3x3minuty a následně promyli v destilované vodě 2x3 minuty. Adherované buňky jsme fixovali pomocí montovacího media Vectashield® s nukleárním kontrastním barvivem DAPI a poté jsme počítali jádra pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu Leica DM IL, vybaveným digitální kamerou Leica DC300F (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Na podložní sklíčko jsme pokládali dvě krycí sklíčka a nechali ve tmě do doby prohlížení v mikroskopu.

3.5. Vyšetření podocytů v moči

3.5.1. Pacienti a vzorky moče

Vyšetření jsme provedli u pěti pacientů s různě velkou proteinurií při diagnózách FSGS u tří pacientů, IgA nefropatie u jednoho pacienta a IgM nefropatie u jednoho pacienta (Tab. 3). Podobně byla vyšetřena zdravá kontrola s negativním nálezem proteinurie, normálními hodnotami kreatininu v séru a s normálním nálezem v močovém sedimentu. Jednoho pacienta (F.B.) s přetrvávající velkou proteinurií jsme současně vyšetřili i po 14ti dnech terapie.

U vybraných pacientů bylo po nočním lačnění odebráno cca 20ml moče ze středního proudu. Dobře označené zkumavky byly do doby podrobnějšího stanovení uloženy v lednici, ne však déle než 2 hodiny. Současně jsme u pacientů vyšetřili moč chemicky, močový sediment, sérový kreatinin a proteinurii z 24 hodinového sběru moče.

Tabulka 3: Specifikace pacientů s proteinurií

Pacient	F.B.	J.V.	F.Ř.	J.W.	B.K.
Diagnóza (t)	FSGS (0)	IgA nefropatie (0)	FSGS (10 let)	FSGS (5let)	IgM nefropatie (8let)
Proteinurie (g/24hod)	4,87	1,94	3,86	1,64	1,51
Kreatinin v séru (μmol/l)	179	169	146	88	75
Moč chemicky	B – 5,00 K - 25 L - 0	B - 5,00 K - 250 L - 0	B - 5,00 K - 150 L - 0	B - 5,00 K - 50 L - 0	B - 5,00 K - 25 L - 0
Močový sediment	ERY - 6 L - 17 E. pl. - 6 E. k. - 2 V. hyal. - 0,3 V.granul. - 0 Bakterie:743	ERY - 126 L - 48 E. pl. - 0,2 E. k. - 0,1 V. hyal. - 0,2 V.granul. - 0 Bakterie:1260	ERY - 276 L - 6 E. pl. - 6,8 E. k. - 3,1 V. hyal. - 0,3 V.granul. - 0 Bakterie:1035	ERY - 561,6 L - 1,2 E. pl. - 9,5 E. k. - 0,3 V. hyal. - 0 V. granul. - 0 Bakterie:784	ERY - 6 L - 18 E. pl. - 35,4 E. k. - 10,1 V. hyal. - 0,8 V.granul. - 0 Bakterie:243

Poznámka k Tab. 3: t- doba od stanovení diagnózy a provedení vyšetření podocytů v moči,

B-bílkovina, K-krev, L-leukocyty, ERY-erytrocyty, E. pl.-epitelie ploché, E. k.-epitelie kulaté, V. hyal.-válce hyalinní, V. granul.-válce granulované

3.5.2. Metodika

Příprava močového sedimentu

Používali jsme ultrafiltry firmy Millipore. Zvolili jsme filtr Ultrafree-CL s membránou Durapore ® o velikosti pórů 5 µm. Póry této velikosti propustily většinu krystalů, bílkovin, hleny a další nežádoucí příměsi, ponechaly však ve zkumavce všechny buněčné elementy.

Průběh separace systémem Millipore:

50 ml zkumavka s močí byla stočena 10 min při 1500 ot./min. Velmi opatrně jsme aspirovali supernatant pomocí plastové pipety a na dně 50 ml zkumavky jsme ponechali buněčný sediment s tekutinou o objemu cca 2 ml. Buněčný sediment jsme přemístili do horního kompartmentu filtrační zkumavky Millipore. Následovala centrifugace 5 minut při 1000 ot./min. Po centrifugaci jsme tekutinu přemístili do dolního kompartmentu centrifugační zkumavky, na filtru a nad filtrem v horní části zůstaly pouze buňky. Vyjmuli jsme filtr a obsah zkumavky nad filtrem jsme přelili do centrifugační zkumavky o objemu 10 ml. Do stříkačky o objemu 10 ml jsme nasáli předchlazený promývací roztok a vymyli stěny a povrch filtru, poté přelili do centrifugační zkumavky o objemu 10 ml. Opět následovala centrifugace 10 minut při 1000 ot./min. Opatrně jsme odstranili co možná nejvíce supernatantu tak, aby se neporušila buněčná vrstva na dně zkumavky.

Výstup z měření značených buněk takto připravené buněčné suspenze byl přijatelný pro další hodnocení.

Zjištění viability buněk

Gatování buněk určených k analýze jsme prováděli pomocí značení jader propidium jodidem, interkalárním barvivem, které neprochází neporušenými membránami živých buněk.

Značení buněk monoklonálními protilátkami

Reagencie:

- Promývací roztok: PBS s 0,1% azidu sodného
- Anti-podocalyxin PE – monoklonální protilátka značená phycoerytrinem (R&D Systems)
- Monoklonální protilátky proti cytokeratinům 6, 8, 18, 19 značené FITC (DAKO Cytomation)

Ke značení podocytů jsme používali monoklonální protilátku proti podocalyxinu značenou phycoerytrinem. Podocalyxin je hlavní sialoprotein podocytů, nachází se na membráně diferencovaných podocytů, má cytoplazmatickou doménu, která se váže na cytoskelet podocyty a ektodoménu, proti které je namířena použitá protilátka. Používali jsme monoklonální protilátku firmy R&D Systems. Jednalo se o produkt hybridomu vzniklého fúzí myších myelomových buněk a B-lymfocytů myši imunizovaných purifikovaným rekombinantním lidským podocalyxinem, přesněji jeho extracelulární doménou. Jak vyplývá z výše uvedeného, jde o konjugovanou monoklonální protilátku s fluorochromem PE.

Jako druhý znak jsme zvolili molekuly cytokeratinů 6, 8, 18 a 19 a monoklonální protilátku proti těmto cytokeratinovým molekulám značenou FITC (Fluorescein Isothiocyanate). Imunogenem při výrobě této monoklonální protilátky je buněčná linie epidermálního karcinomu A431 a protilátka specificky reaguje s buňkami epiteliálního původu. Úmyslem bylo odlišit případné podocyty od ne-epiteliálních buněk v sedimentu. Jsme si však vědomi toho, že tímto značením jsme získali „falešnou pozitivitu“ z odloupaných buněk epiteliální výstelky močových cest.

Promývací roztok brání pohybu povrchového antigenu směrem k jednomu pólu buňky po zesíťování antigenů specifickou protilátkou a internalizaci povrchových znaků.

Pracovali jsme v chladu, s teplotou roztoku 4°C. Fixaci jsme neprováděli, jelikož buňky byly měřeny ihned po označení protilátkou.

Průtoková cytometrie

Touto technikou lze pomocí označení buněk specifickou protilátkou kvantitativně analyzovat velké množství částic (např. buněk) v suspenzi. Parametrem průtokové cytometrie může být fyzikální nebo chemická vlastnost buňky (granularita, velikost, životnost a další) a vše, co můžeme označit monoklonální protilátkou (povrchové molekuly, intracelulární molekuly apod.).

Buňky obarvené různými fluorochromy jsou unášeny laminárním proudem nosné kapaliny, fluorescence se excituje paprskem světla (laseru). Nosná kapalina usměřňuje buňky do velmi tenkého proudu, v průtokové komůrce postupují jedna za druhou a protínají světelný paprsek. Světlo, které vzniká interakcí buněk při průchodu tímto světelným/laserovým paprskem se následně dělí podle vlnové délky emitované fluorescence. Jednotlivé signály jsou převedeny na elektrické impulsy a zesíleny fotonásobičem. Počítačové zpracování naměřených dat umožňuje získávat údaje o skupinách buněk na základě vybraných znaků, tzv. „gatování“ (z angl. „gate“ neboli brána, vstup).

Výstupem měření na průtokovém cytometru jsou výsledky v grafické a číselné formě. Nejčastěji využívané reagenty pro průtokovou cytometrii jsou monoklonální protilátky, které mají homogenní specifitu, jsou zaměřeny proti jedinému epitopu a mají definovaný izotyp. Používá se jak přímá imunofluorescence, kdy je protilátka proti zkoumanému antigenu přímo značená fluorochromem – tato metoda má výhodu v jednodušším zpracování vzorku – a rovněž nepřímá imunofluorescence, kdy je třeba použít druhou fluorochromem značenou protilátku proti monoklonální protilátce (tímto způsobem lze dosáhnout silnějšího signálu a metoda je vhodná pro slabě exprimované antigeny).

Ke stanovení podocytů v moči jsme používali průtokový cytometr FACS Calibur firmy Becton Dickinson.

Odběr, transport a následné zpracování vzorku moči vede k odumření menší části buněk. Počítačovou analýzou po značení monoklonálními protilátkami následně procházely pouze buňky živé, definované v PI gate (Graf 1).

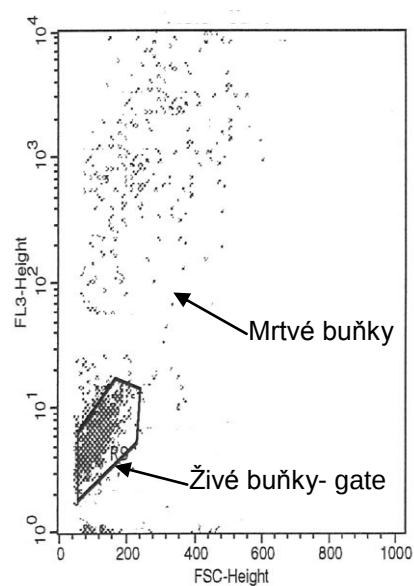
Graf 1: Separace Millipore

Poznámky ke Grafu 1:

Dvouparametrový histogram („density plot“) graficky znázorňující hustotu jednotlivých bodů.

Osa X: FSC („forward scatter“) – ukazuje na rozptyl velikosti naměřených částic

Osa Y: SSC (side scatter) – definuje granularitu částic



PI

4. Výsledky

4.1. Klinicko-laboratorní studie

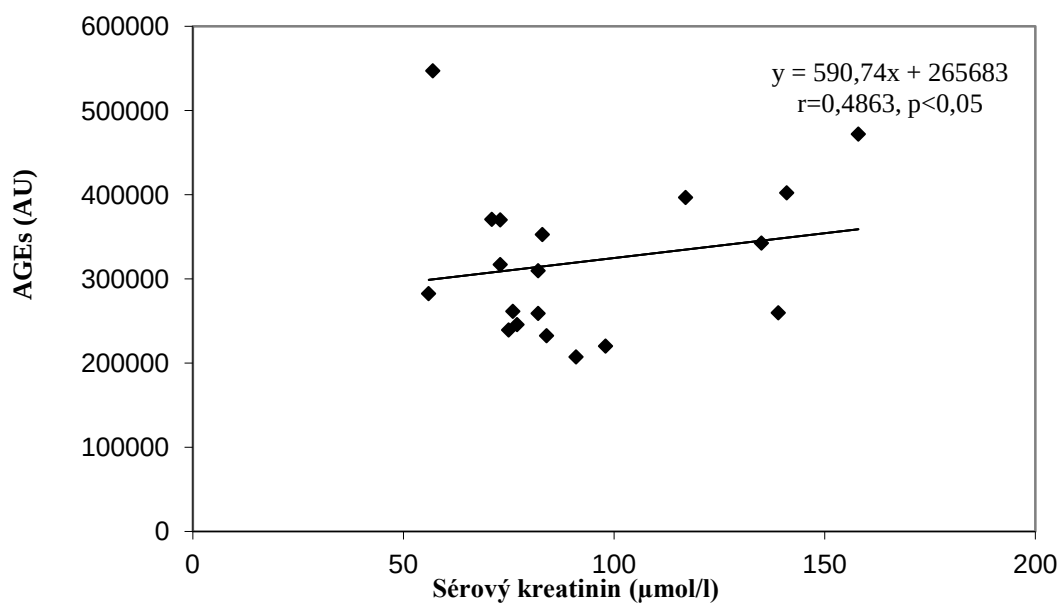
4.1.1. AGEs u nefropatií s mírnou renální insuficiencí

Hladiny AGEs u pacientů s různými typy nefropatií (lupusovou nefritidou, IgA nefropatií, membranózní nefropatií, ANCA asociovanou vaskulitidou) a sérovou hladinou kreatininu pod 200 $\mu\text{mol/l}$ se signifikantně nelišily od zdravých dárců (Tab. 4). Nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v hladinách AGEs mezi jednotlivými typy nefropatií s normální nebo mírně zvýšenou hladinou kreatininu (Tab. 4). Byla však nalezena signifikantní korelace mezi sérovými hladinami kreatininu a AGEs u pacientů s lupusovou nefritidou ($r = 0,4863$; $p < 0,05$) a u pacientů s IgA nefropatií ($r = 0,7042$; $p < 0,005$) (Graf 2, 3).

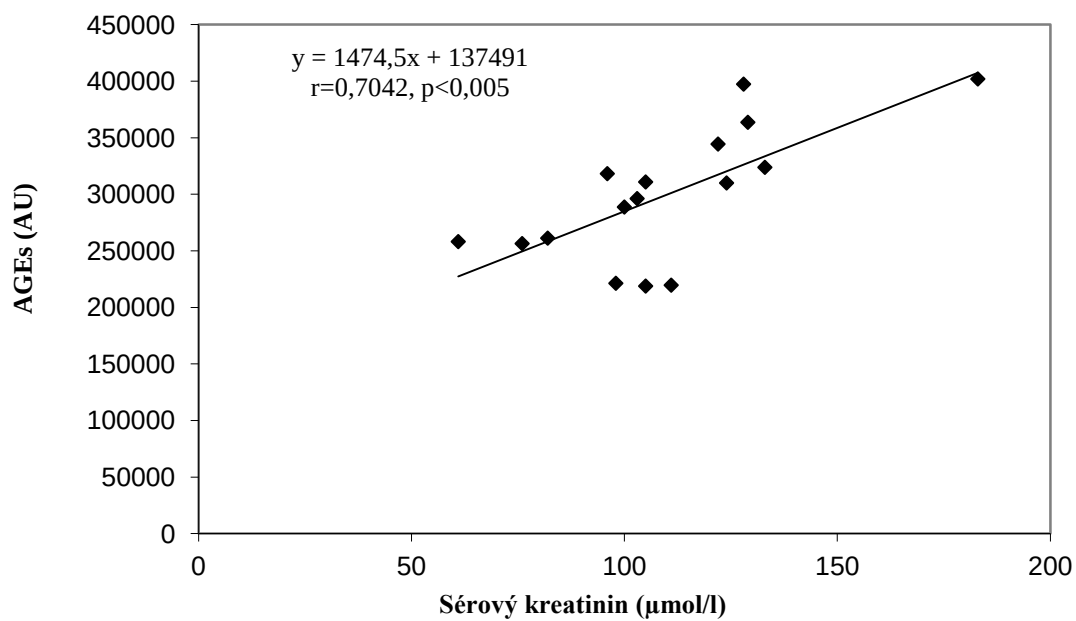
Tabulka 4: Typ nefropatie a hladiny AGEs

Typ nefropatie	AGEs (AU)
Lupusová nefritida (N=18)	$3,08 \pm 0,72 \times 10^5$
IgA nefropatie (N=17)	$2,99 \pm 0,67 \times 10^5$
Membranózní nefropatie (N=16)	$3,01 \pm 1,01 \times 10^5$
ANCA asociovaná vaskulitida (N=9)	$3,18 \pm 0,90 \times 10^5$
Zdravé kontroly (N=15)	$2,95 \pm 0,17 \times 10^5$

Graf 2: Korelace sérových hladin kreatininu a AGEs u pacientů s lupusovou nefritidou



Graf 3: Korelace sérových hladin kreatininu a AGEs u pacientů s IgA nefropatií



4.1.2. Asociace AGEs s nutričními parametry a anémií u pacientů s chronickým onemocněním ledvin

Trend zvyšujícího se BMI u CKD 4 a CKD 5 ve srovnání s kontrolami ($p=0,02$) můžeme pozorovat v Tab. 1, kde jsou zobrazena klinická, demografická a laboratorní data studijních skupin a kontrol.

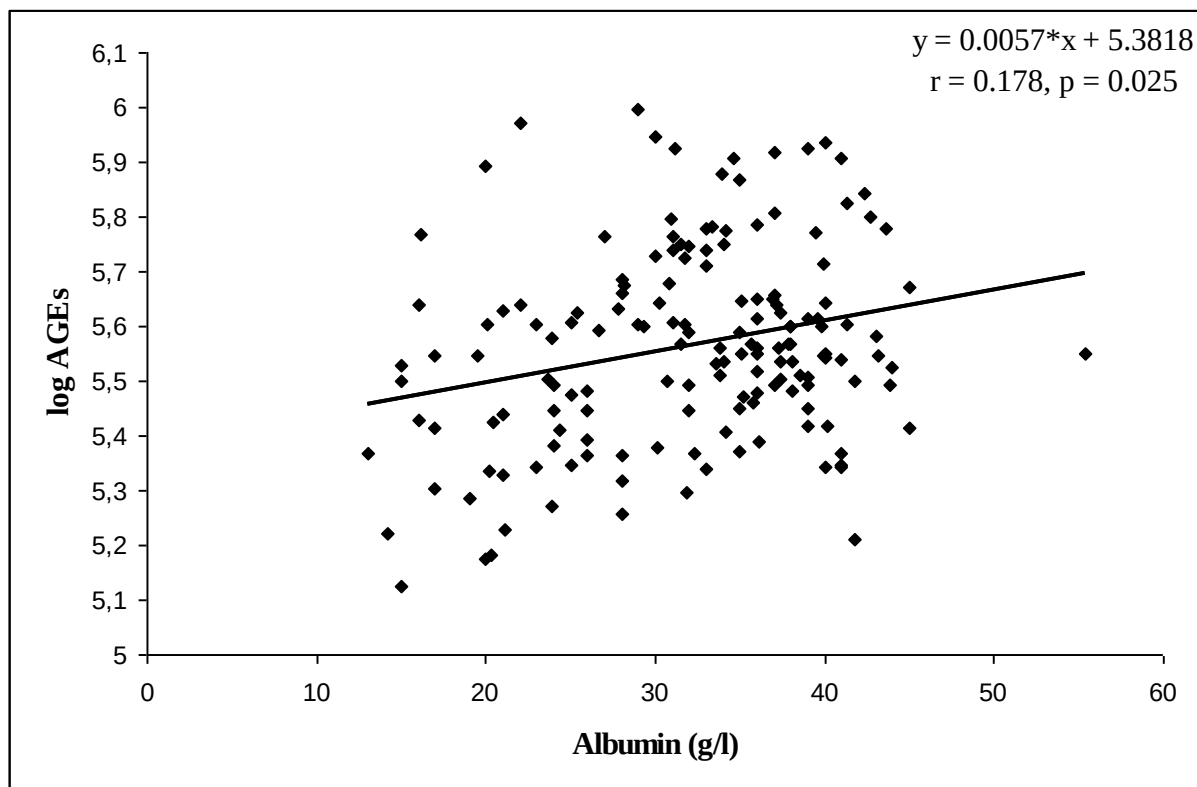
Střední sérové koncentrace AGEs v různých stádiích CKD byly $3,9 \pm 1,7 \times 10^5$ AU. Sérové koncentrace AGEs byly zvýšeny u skupin pacientů od stádia CKD 3 ($3,7 \pm 1,4 \times 10^5$ AU; $p < 0,0001$), podobně jako sérové hladiny orosomukoidu ($1,25 \pm 0,56$ g/l; $p < 0,0001$).

Pacienti s různým stupněm CKD s pozitivní anamnézou kardiovaskulárního onemocnění měli podobné hodnoty sérových hladin AGEs jako pacienti bez přítomnosti kardiovaskulárního onemocnění. Podobně nebyly pozorovány rozdíly v sérových hladinách AGEs u pacientů s různým stupněm CKD a současně s DM či bez něj.

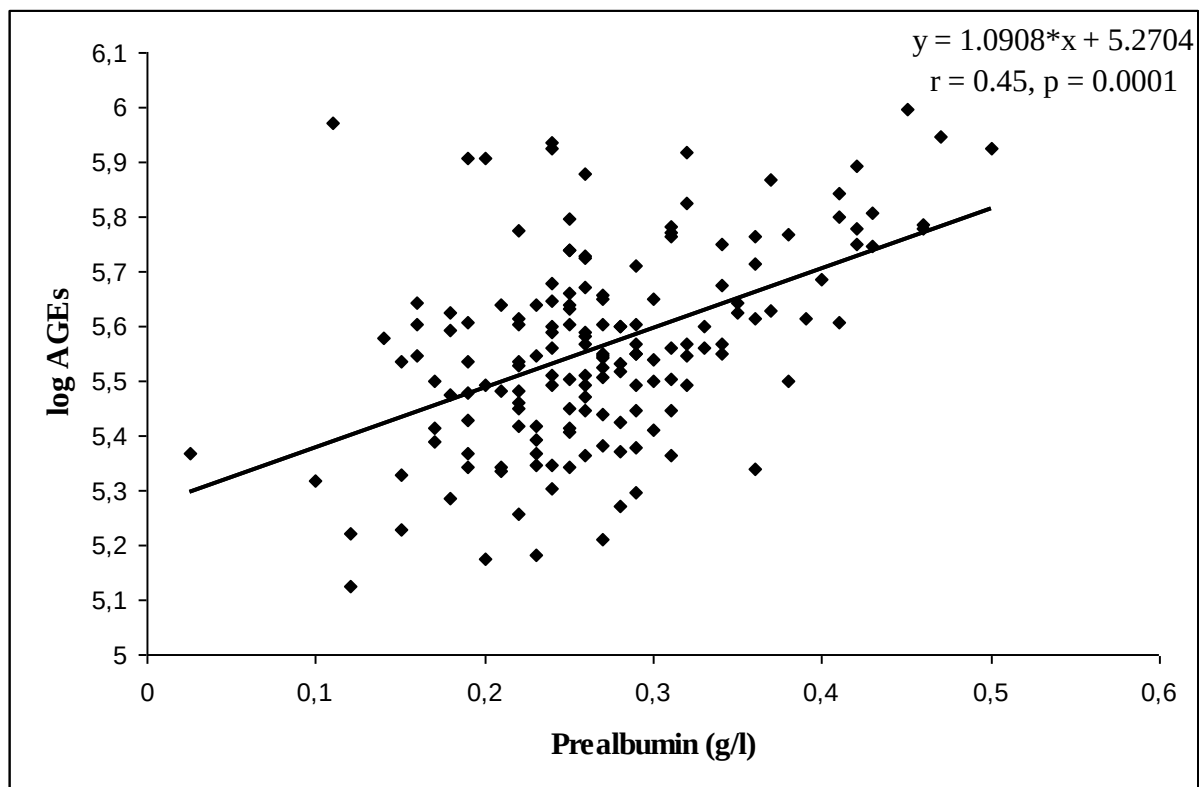
Statisticky signifikantně korelovaly sérové hladiny AGEs s věkem ($r=0,206$; $p=0,009$), albuminem ($r=0,178$; $p=0,025$) (Graf 4), prealbuminem ($r=0,45$; $p=0,0001$) (Graf 5), orosomukoidem ($r=0,269$, $p=0,001$); a inverzně s eGFR ($r= - 0,517$; $p=0,0001$) a s hemoglobinem ($r= - 0,36$; $p=0,0001$) (Graf 6).

Parametry ovlivňující sérové hladiny AGEs jsme hodnotili také pomocí vícenásobné regresní analýzy. Po vztažení na věk byla signifikantní korelace AGEs pozorována u albuminu ($p=0,0006$), prealbuminu ($p < 0,0001$) a hemoglobinu (inverzně $p < 0,0001$). Nezávislý vztah k sérovým hladinám AGEs byl nalezen u eGFR ($R^2=0,45$) (Tab 5).

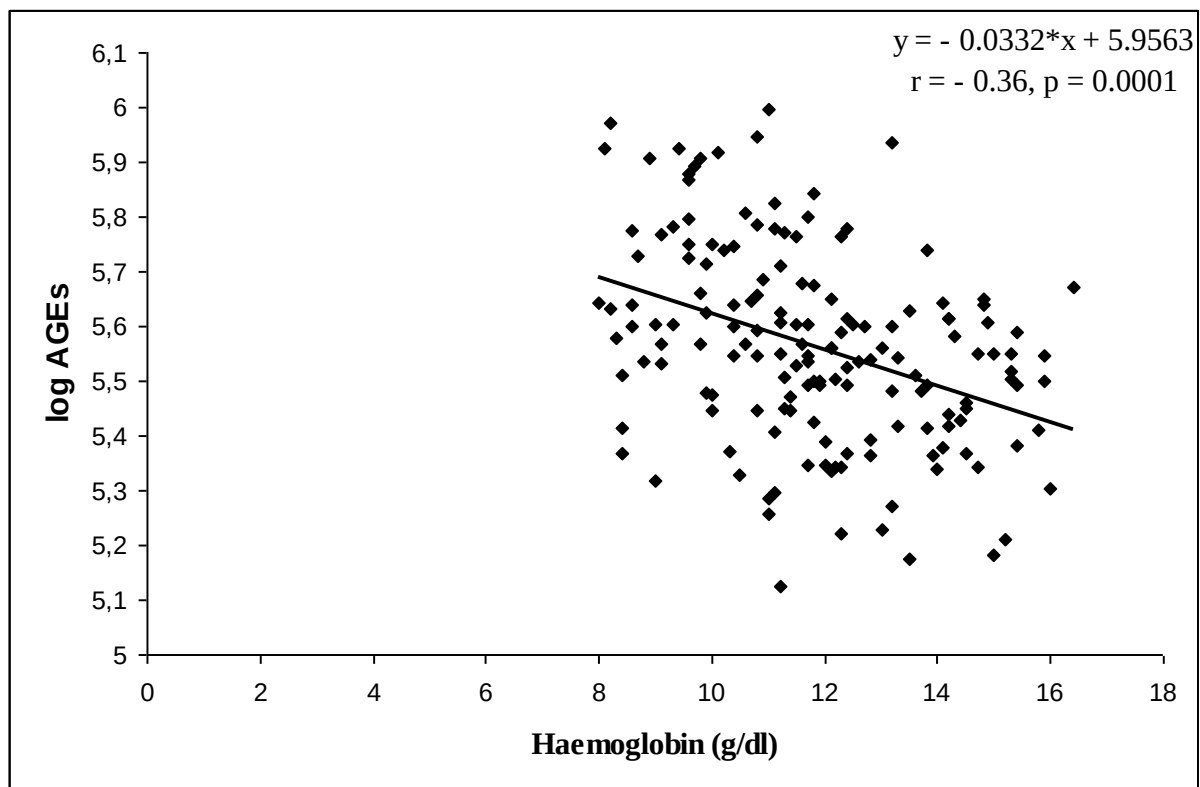
Graf 4: Logaritmická korelace AGEs s albuminem u pacientů s CKD 1-5



Graf 5: Logaritmická korelace AGEs s prealbuminem u pacientů s CKD 1-5



Graf 6: Logaritmická korelace AGEs s hemoglobínom u pacientů s CKD 1-5



Tabulka 5: Faktory související s AGEs. Multivariantní regresní analýza se sérovou hladinou AGEs jako nezávislou proměnou (vztaženo na věk a eGFR)

Nezávislé proměnné	B koeficient	SE	T	P	intercept	R^2
Albumin	0,0049	0,0014	3,49	=0,0006	5,6	0,45
Prealbumin	1,016	0,141	7,19	<0,0001		
Hemoglobin	-0,0039	0,00053	-7,53	<0,0001		

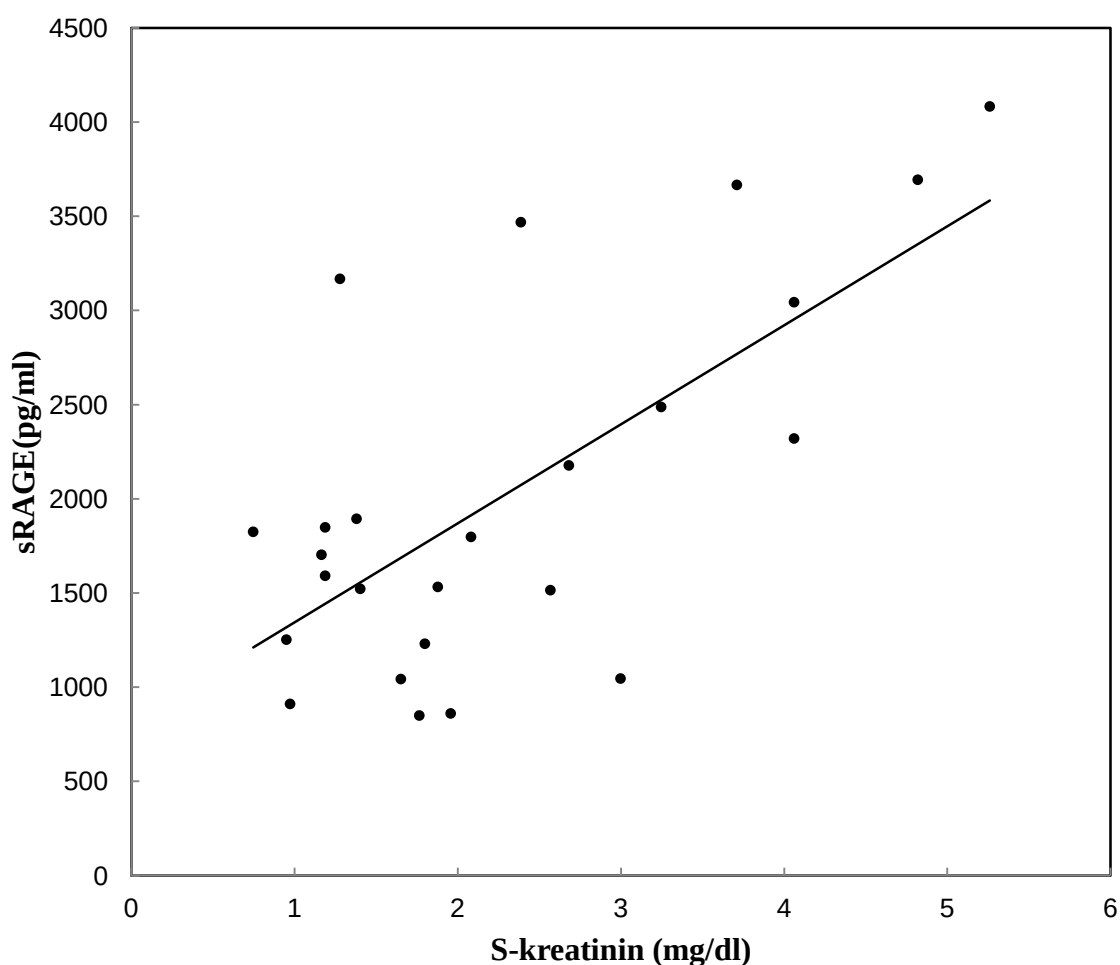
Poznámka k Tab. 5: B – beta koeficient, SE – standardní chyba, T – statistický test,

R^2 – koeficient determinace

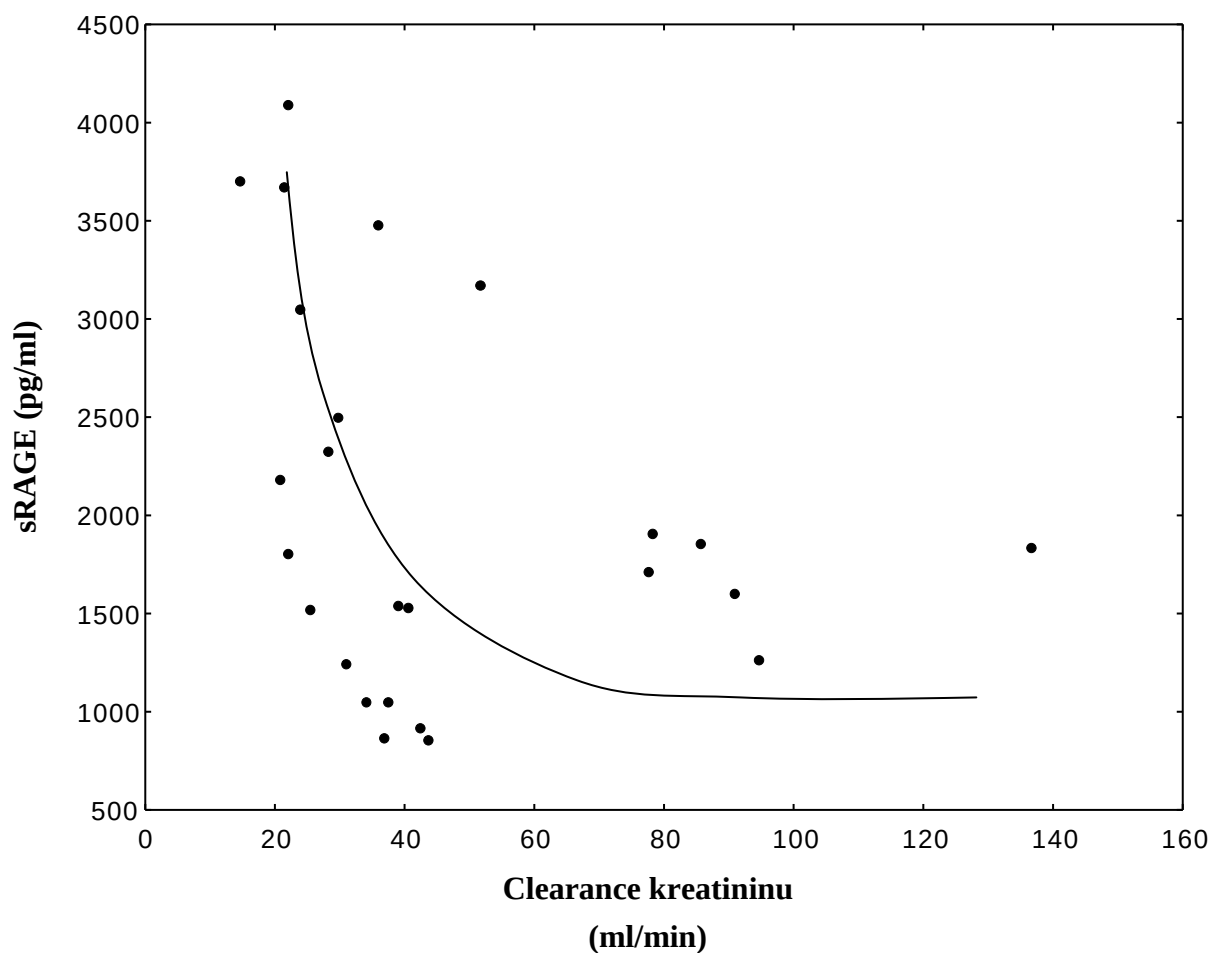
4.1.3. Vliv funkce ledvin na hladiny sRAGE u pacientů s chronickým onemocněním ledvin

U pacientů s chronickým onemocněním ledvin s různým stupněm renální insuficience korelovaly sérové hladiny sRAGE signifikantně pozitivně s koncentrací sérového kreatininu ($r=0,50$; $p<0,05$) (Graf 7) a negativně s reciproční hodnotou glomerulární filtrace ($r=0,53$; $p<0,05$). Vztah kreatininové clearance je hyperbolický (Graf 8). U pěti pacientů s nefropatiemi bylo sRAGE detekováno i ve vzorcích moči (25; 64; 1,027; 54 a 102 pg/ml) a u čtyř z těchto pacientů byla přítomna těžká proteinurie ($>3,5$ g/24 hod). U ostatních pacientů s hladinou sRAGE v moči nižší než je detekční limit, byla proteinurie nižší než 2 g/24hod.

Graf 7: Korelace sérových hladin sRAGE s koncentrací sérového kreatininu



Graf 8: Vztah mezi sérovými hladinami sRAGE a clearance kreatininu



Poznámka ke Grafu 7 a 8: publikováno v AJKD, Vol 47, No 3 (March), 2006: pp 406-411

převodní faktory: kreatinin mg/dl = 88,4 μ mol/l

Clearance kreatininu ml/min = násobku 0,01667 ml/s

4.2. Experimentální studie

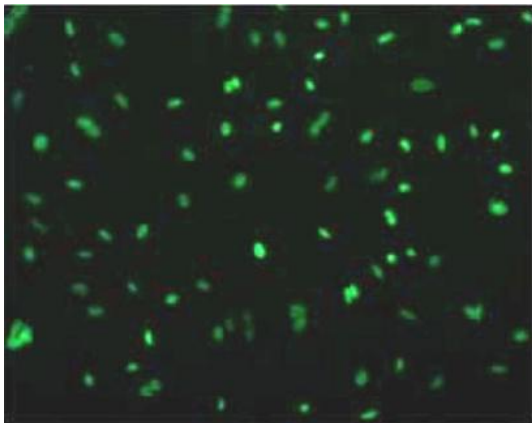
4.2.1. Kultivace podocytů

Glomeruly z ledvin potkana kmene Wistar jsme získali pomocí „sieving method“ se závěrečným použitím sítky o velikosti pórů 75 μ m. Počáteční rozrůstání buněk probíhalo na fibronectinu. Při pasážování jsme používali kolagen typu I a sledovali jsme také rozrůstání buněk pouze na plastovém povrchu.

Před prvním pasážováním jsme pod fázovým mikroskopem pozorovali směs glomerulárních buněk a oblasti s buňkami podobnými „cobblestones“. V dalších pasážích bylo možné pozorovat dlouhé „arborizované“ buňky. Buňky jsme počítali po označení jader propidium jodidem v komůrce.

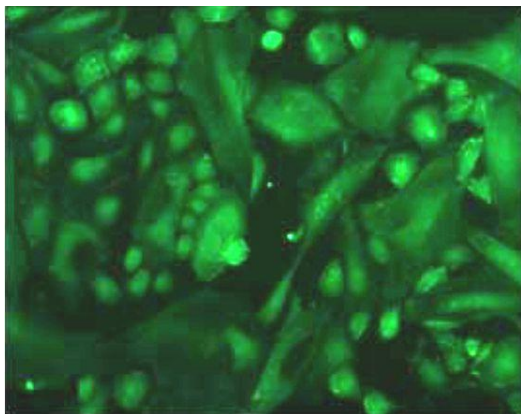
Osvojili jsme si také techniku kultivace imortalizovaných podocytů, jejichž získání je snažší a jistota, že se jedná o podocyty je téměř stoprocentní .

Pomocí imunocytochemie jsme stanovovali několik proteinů typických pro podocyty. Zaměřili jsme se především na WT-1, jehož pozitivita je typicky nukleární (Obr. 6) a synaptopodin, kde je lokalizace cytoplazmatická (Obr. 7).



Obrázek 7: *Exprese WT-1; nukleární pozitivita*

- 2. pasáž na kolagenu typu I, ředění primární protilátky 1:20, sekundární protilátky 1:50



Obrázek 8: *Exprese synaptopodinu; cytoplazmatická, cytoskeletální lokalizace*

- 2. pasáž na kolagenu typu I, ředění primární protilátky 1:100, sekundární protilátky 1:50

4.2.2. Detekce podocytů v moči u pacientů s onemocněním ledvin

Metodou průtokové cytometrie jsme, po označení monoklonálními protilátkami proti podocalyxinu a cytokeratinu, stanovovali močové podocyty. Úmyslem užití minimálně dvou znaků, bylo odlišit případné podocyty od ne-epiteliálních buněk v sedimentu, ač jsme si byli vědomi toho, že označením pomocí cytokeratinu získáme „falešnou pozitivitu“ z odloupaných buněk epiteliální výstelky močových cest. Hodnotitelných výsledků jsme začali dosahovat až po optimalizaci přípravy močového sedimentu. Vyšetřili jsme pouze menší množství pacientů, u kterých jsme si byli jisti správností a reprodukovatelností výsledku.

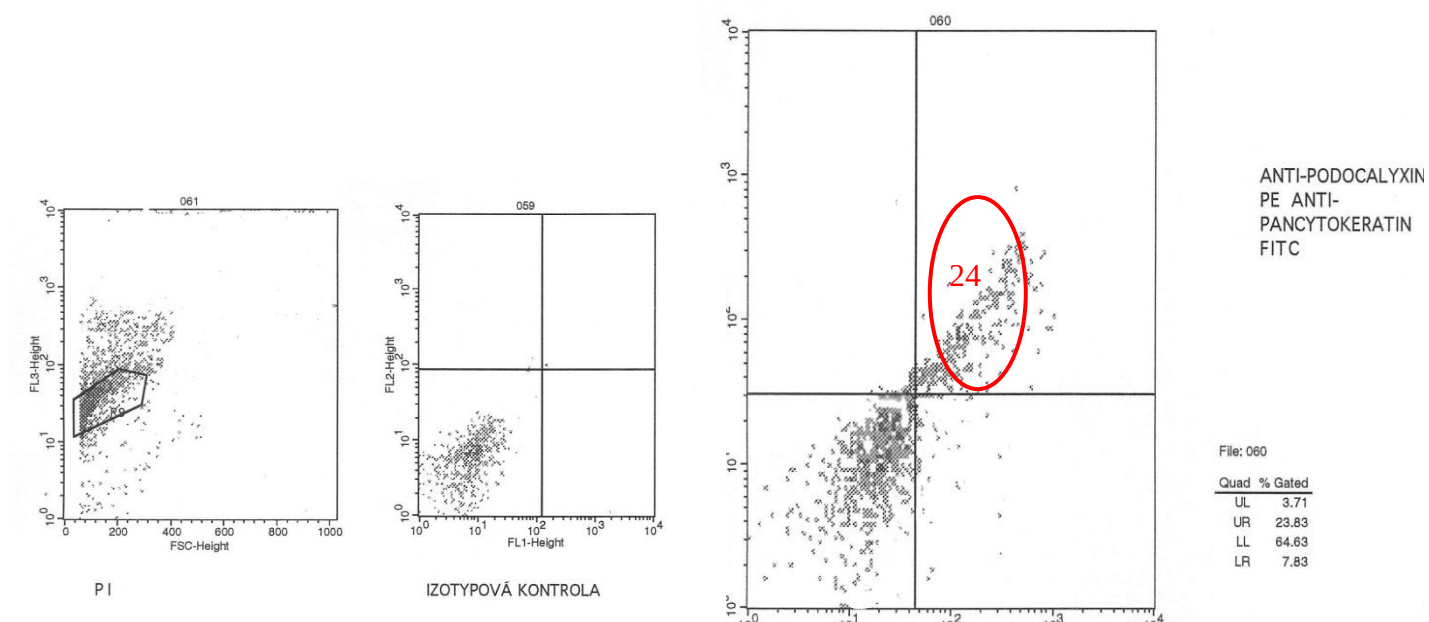
Kontrola ukazuje množství vazeb monoklonální protilátky, které nesouvisejí s našimi cílovými antigeny, tato neimunologická vazba může být způsobena např. Fc receptory na buňkách. Na ose X - anti-pancytokeratin FITC negativní/pozitivní buňky, na ose Y anti-podocalyxin PE negativní/pozitivní buňky. Double-pozitivní buňky v pravém horním kvadrantu jsou velkou pravděpodobností podocyty.

Pacienta F.B. s významnou proteinurií a aktivní glomerulonefritidou jsme vyšetřili dvakrát. Vstupně byla jeho proteinurie 4,87g/24hod a metodou průtokové cytometrie bylo nalezeno celkem 24 podocytů. Po 14 dnech imunosupresivní terapie jsme vyšetřili pacientovu moč opět na močové podocyty, tehdy měl pouze minimální pokles proteinurie (4,2g/den), ale podocyturie klesla na 14 podocytů v moči (Graf 9 a 10).

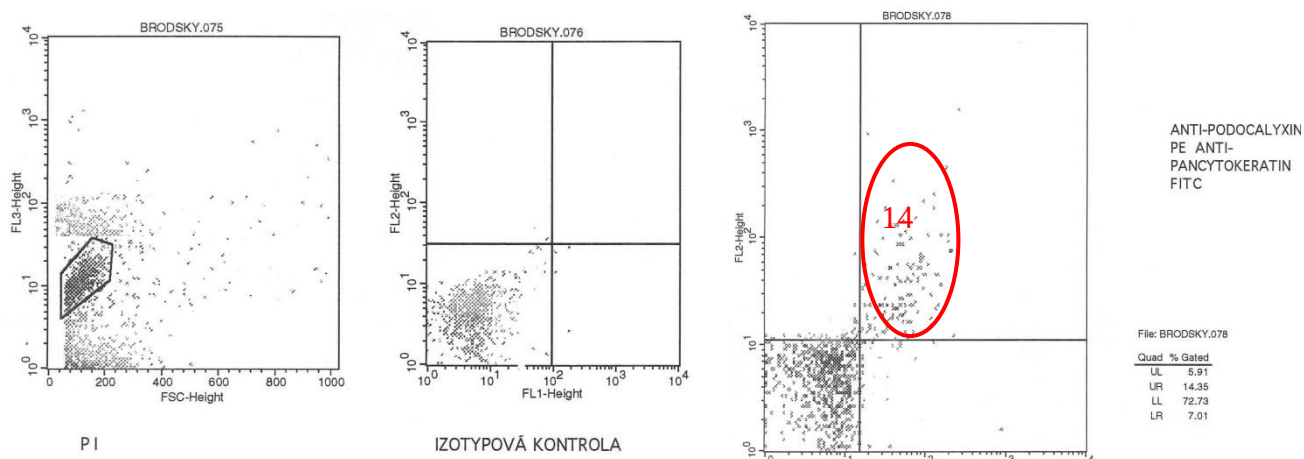
Další pacient F.Ř., u něhož byla proteinurie 3,86g/24hod a diagnóza stanovena před 10ti lety před vyšetřením, byl nalezen pouze 1 podocyt v moči. Naopak pacient J.V. s menší proteinurií 1,94 g/24hod a diagnózou stanovenou v době našeho vyšetření měl detekován v moči 7 podocytů. U dalších dvou pacientů (J.W. a B.K.) s o něco menší proteinurií a diagnózou zjištěnou před více než 5 lety bylo nalezeno 0 a 2 podocyty (Tab. 3).

Průtoková cytometrie - buňky označené monoklonálními protilátkami proti podocalyxinu a cytokeratinu

Graf 9: Pacient F.B. s proteinurií 4,87g/den - první vyšetření



**Graf 10: Pacient F.B. po 14 dnech imunosupresivní terapie – proteinurie 4,2g/den
– druhé vyšetření**



Poznámky ke Grafům 9, 10:

- gatování pomocí PI
- nespecifická izotypová kontrola (myší protilátky IgG1 FITC/ IgG2 PE)
- osa X - anti-pancytokeratin FITC negativní/pozitivní buňky
osa Y anti-podocalyxin PE negativní/pozitivní buňky

5. Diskuse

5.1. Klinicko-laboratorní studie

Patogeneze mnoha onemocnění a jejich komplikací je spojena s oxidačním stresem a zvýšenou tvorbou AGEs. Metodika stanovení produktů pokročilé glykace je rozmanitá. Vzhledem k tomu, že řada AGEs vykazuje právě charakteristickou fluorescenci je detekce spektrofluorimetrií nejvíce dostupná, ačkoliv méně přesná metoda, která byla v době, kdy jsme se tímto tématem zabývali k dispozici a ve světě využívána. Impaktované publikace, které prošly recenzí jsou dokladem, že byla tato metoda akceptována (77). Fluorescenčním stanovením neměříme žádný z konkrétních AGE-produktů, ale pouze fluoreskující glykoxidační produkty, v nichž jsou nejvíce zastoupeny crosslinky (73). Nicméně AGEs jsou velká heterogenní skupina látek a stanovíme tedy jen část této skupiny. Pro zkoumání reakčních produktů v určitém místě a čase se používají analytické postupy, u kterých nedochází ke zkreslení výsledků tím, že by byly podporovány další reakce. Z tohoto důvodu se v dnešní době upřednostňují metody rychlé a jednoduché jako je například vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), kterou lze stanovit pentosidin (fluorescenční detekce) a pyralin (UV detekce). Metodou ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je možné s použitím monoklonálních či polyklonálních protilátek stanovit AGEs jako celou skupinu (např. CML, pentosidin či imidazolon). Hmotnostní spektrometrie (GC/MS – Gas Chromatography/Mass Spectrometry) je nejlepší, nejpresnější, ale také nejnáročnější metoda charakterizace AGEs (např. CML, GOLD) (17).

V průběhu glomerulárního a tubulointersticiálního poškození a při rozvoji uremických komplikací dochází k amplifikaci lokální imunitní a zánětlivé odpovědi. Malé molekuly AGE mohou po filtraci do moči podstoupit další degradaci a modifikaci vzhledem k tomu, že jsou částečně reabsorbovány buňkami proximálního tubulu (78). Tyto peptidy AGE s malou molekulární hmotností mohou být pro tubulární buňky více toxické než větší proteiny AGE (79).

Všechny části ledvin jsou schopné akumulovat AGEs, především buňky bazální membrány, mesangiální a endoteliální buňky, podocyty či tubuly (80). Imunohistochemicky byly prokázány glykoxidační produkty v glomerulu a v cévách u pacientů i s incipientní diabetickou nefropatií. Ve srovnání se zdravými ledvinami, byla významná akumulace CML pozorována v mesangiální matrix a v kapilární stěně taktéž již v časných nodulárních lézích (81), podobně tomu bylo i v případě akumulace imidazolonu (82).

Nadprodukce kolagenu a jeho snížená rozpustnost vlivem zesíťování kolagenu s následným významným zesílením glomerulární bazální membrány bylo pozorováno např. u skupiny exponované methylglyoxalu (83).

AGEs je tedy možné pozorovat ve tkáni ledvin například u pacientů s IgA nefropatií, lupusovou nefritidou, hypertenzní nefropatií, renální fibrózou či chronickou transplantační rejekcí (11; 84; 85). K dispozici je celá řada prací, kde je popisován výskyt např. pentosidinu a CML ve sklerotických glomerulech u pacientů s primární i sekundární formou FSGS či hypertenzní nefropatií. Podobně i v aktivních nekrotizujících glomerulárních lézích u pacientů se SLE, kde však nebyly přítomny v mezangiu či GBM (86). CML nebyl prokázán u IgA nefropatie, kde byla naopak pozorována pozitivita pro malondialdehyd lysin (87). Je třeba zdůraznit, že na rozdíl od diabetické nefropatie byly AGEs pouze zřídka pozorovány v mezangiu či v glomerulární bazální membráně nesklerotických glomerulů.

Klíčová role AGEs během glomerulárního a tubulointersticiálního poškození či při komplikacích u pacientů s renální insuficiencí je nadále podrobně zkoumána, stejně tak jejich role v účasti na lokální a zánětlivé odpovědi v ledvinné tkáni (88). V naší první práci jsme se zaměřili na pacienty s normální či mírně elevovanou koncentrací kreatininu a s různými typy nefropatií. Pozorovali jsme, podobně jako v jiných pracích, inverzní vztah sérových hladin AGEs a glomerulární filtrace. Významné zvýšení sérových hladin AGEs u pacientů s nefropatiemi a s normální nebo mírně zvýšenou sérovou hladinou kreatininu jsme nenalezli. Nebyly také nalezeny signifikantní rozdíly v hladinách AGEs mezi různými typy nefropatií, i když mají rozdílnou patogenezi. Zvýšení sérových hladin AGEs u pacientů s renální insuficiencí není pouze následkem jejich sníženého vylučování ledvinami, ale též následkem zvýšeného oxidačního a karbonylového stresu a snížením antioxidační ochrany enzymů a jejich kofaktorů (Zn, Se, vitaminy) (89).

AGEs se jako uremické toxiny (90) podílí na patogenezi celé řady komplikací u pacientů s chronickým selháním ledvin jako je amyloidóza spojená s dialýzou či poškození peritonea u pacientů léčených peritoneální dialýzou (91). Koncentrace pentosidinu mohou být u pacientů s konečným selháním ledvin ve srovnání se zdravými kontrolami až 10x vyšší (92). Pentosidin a CML patří mezi hlavní AGEs u uremických pacientů a jsou většinou vázány na albumin (~ 90%), jehož molekulární hmotnost je ~ 69 kDa (92). Tyto AGEs s velkou molekulární hmotností nemohou být tedy odstraňovány glomerulární filtrací nebo dialýzou v dostatečném množství (93).

Hemodialýzou je však možné odstranit mnohem menší reaktivní karbonylové prekurzory s typickou molekulární hmotností $< 5,000$ Da (94), vyšší účinnost byla zjištěna při použití high flux membrán (membrán s větší propustností pro středněmolekulární látky) (95). Nízkomolekulární AGEs, stejně jako CML byly popsány jako prediktory mortality chronicky hemodialyzovaných pacientů (96).

Po transplantaci ledviny AGE frakce s vysokou molekulární hmotností nezmizí rychle z cirkulace i přes zlepšení renální funkce. Naopak množství AGE frakce s velmi malou molekulární hmotností se sníží velmi rychle, právě díky zlepšení exkrece AGEs a zvýšeným renálním metabolismem (97).

V době, kdy vznikala naše práce byla celosvětově užívána klasifikace chronického onemocnění ledvin (CKD) z roku 2002 dle KDOQI (Clinical Practice Guidelines for Chronic kidney disease) (98). Klasifikace v našich pracích je tedy odlišná od současné nové klasifikace dle KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) doporučení z roku 2012, která byla publikovaná v lednu 2013 v Kidney International 3. suppl. a tato klasifikace je v současné době používána i u nás. Jedná se o update doporučení z roku 2002 a nejpodstatnějším rozdílem v těchto dvou klasifikacích je ve zohlednění přítomnosti albuminurie a rozdělení CKD 3 na CKD G3a a 3b. Další změnou je stanovování odhadované glomerulární filtrace. V době vzniku naší práce byl doporučován vzorec MDRD, od roku 2012, dle stejných doporučení, již vzorec CKD-EPI pro kreatinin.

Obecně tedy u pacientů s diabetes mellitus a chronickým onemocněním ledvin (CKD), zejména u pacientů léčených hemodialýzou či peritoneální dialýzou, jsou přítomny podmínky podporující tvorbu AGEs (11; 99; 100; 101). Někteří autoři nepopsali rozdíl v sérových hladinách AGEs u chronicky dialyzovaných pacientů s a bez přítomnosti diabetu (102), jiní naopak ano (103). V naší práci jsme rozdíl mezi sérovými hladinami AGEs u pacientů s CKD a DM, či bez něj, nenalezli, interpretace těchto výsledků je jistě ovlivněna malým počtem diabetiků (14%) zařazených do naší studie. Na rozdíl od diabetiků nekoreluje u pacientů s CKD sérové hladiny AGEs se sérovou hladinou Amadoriho produktu fruktosaminu a jejich vznik tedy není vysvětlen jako důsledek hyperglykémie a klasické Maillardovy reakce (95). I z výsledků naší práce vyplývá, že zvýšené sérové hladiny AGEs, které nacházíme u pacientů s CKD, jsou významnějším faktorem pro akumulaci AGEs než dlouhodobá hyperglykémie u pacientů s CKD a s DM.

Oxidační stres jako následek excesivní produkce volných kyslíkových radikálů nebo nízké hladiny antioxidantů je důležitým faktorem pro rozvoj endoteliální dysfunkce a aterosogeneze (104). V případě aterosogeneze jsou AGEs akumulovány v cévní stěně, vedou k zesílení proteinů a následná zvýšená tvorba extracelulární matrix v intimě vede ke ztlustění cévní stěny a zužení lumen. Současně dochází k blokování vazodilatačního účinku oxidu dusnatého s následnou vazokonstrikcí, poškození endotelu, stimulaci produkce cytokinů a růstových faktorů, což následně vede k vaskulární proliferaci. AGEs modifikují LDL částice a společně s vaskulárním poškozením vedou k akceleraci aterosklerosy (105). AGEs mohou být užitečným biomarkerem k vyhodnocení vztahu mezi diabetem a aterosklerosou u stárnutí a diabetu (106). Účast AGEs na progresi aterosklerosy, která pozitivně koreluje s kardiovaskulární mortalitou i u pacientů s negativní anamnézou diabetu, je také nesporná (107). V jedné práci byly vyšetřovány hladiny pentosidinu u 386 hemodialyzovaných pacientů, kteří byli dále sledováni po dobu pěti let. Ti, kteří měli vysoké hladiny pentosidinu měli signifikantně vyšší kardiovaskulární riziko, většina těchto pacientů měla současně nízké hladiny albuminu (108). V naší práci jsme u pacientů s CKD, kteří ještě nebyli dialyzováni, rozdíl v sérových hladinách AGEs, v případě přítomnosti nebo absence kardiovaskulárního onemocnění, nenalezli.

Albumin, prealbumin a hemoglobin patří mezi důležité rizikové faktory malnutrice, zánětu, aterosklerózy a anemie (109; 110; 111). V naší práci jsme se zaměřili na analýzu pacientů s různými typy nefropatií, kteří ještě nebyli dialyzováni a to z několika důvodů. Postižení ledvin, spojené právě s AGEs, bylo popsáno nejen při diabetické nefropatii či chronickém renálním selhání, ale i chronickém zánětu, vyšším příjmu AGEs a stárnutí (112; 81; 113). U pacientů s CKD, bez nutnosti náhrady funkce ledvin, jsme našli pozitivní vztah AGEs s věkem, albuminem, prealbuminem a orosomukoidem a negativní vztah AGEs s eGFR a hemoglobinem. Naše výsledky svědčí o tom, že u pacientů s různými typy nefropatií existuje vzájemné ovlivnění mezi renálními funkcemi, nutričními parametry, zánětem a hladinami AGEs. Existuje i určitá možnost vztahu mezi hladinami AGEs, markery nutrice a anemie, jsou-li analyzovány společně. Cirkulující AGEs jsou jednoznačně v určitém smyslu propojeny s plazmatickými proteiny, především albuminem (114) a akumulace AGEs v plazmatických proteinech by mohla být prisuzována snížení renální clearance proteinů spojenými s AGEs. Korelaci sérových hladin AGEs s proteinurií jsme nenalezli, každopádně zvýšené hladiny AGEs s velkou pravděpodobností vedou ke zvýšení proteinurie u pacientů s CKD.

Pacienti s chronickým onemocněním ledvin mají z dostupných dat jednoznačně vysoké riziko malnutrice a probíhá u nich chronická zánětlivá reakce. Nízké hladiny albuminu, prealbuminu a transferinu se podílí na aktivaci zánětu (115). Sérové hladiny CRP a orosomukoidu jsou ovlivněny přítomností chronického onemocnění ledvin (116), podobně jako jsou AGEs jedním z parametrů dlouhodobě probíhajícího oxidačního poškození (117). V naší práci jsme vztah mezi sérovými hladinami AGEs a CRP nenalezli, pravděpodobně vzhledem k vysoké inter-individuální variabilitě, ale našli jsme vztah sérových hladin AGEs a orosomukoidu. Současně jsme prokázali zvýšení hladin AGEs a orosomukoidu se snižující se renální funkcí, jako jednoho z dalších potvrzujících faktorů mikrozánětu a oxidačního stresu u pacientů s CKD.

Současně je i obezita rizikovým faktorem pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění a CKD. Bylo zjištěno, že vzestup sérových hladin AGEs nebyl závislý na BMI, nebyl také zjištěn statisticky významný rozdíl mezi skupinou obézních a neobézních nemocných s CKD nebo chronicky hemodialyzovaných (118). U pacientů s chronickým onemocněním ledvin bez nutnosti náhrady funkce ledvin, jsme našli stejný vztah k nutričnímu stavu jako u hemodialyzovaných pacientů. BMI u pacientů s CKD G4 a CKD G5 byl signifikantně vyšší, což nasvědčuje tomu, že pacienti v těchto skupinách měli nadváhu. Současně byla u obézních pacientů s CKD G3-4 nalezena zvýšená exprese prozánětlivých cytokinů a zvýšená infiltrace imunokompetentními buňkami (119). Otázka rostoucího BMI ve vztahu k AGEs a nutričním parametrům u progresivních stádií CKD nadále zůstává.

Podobně jako v práci Thomase et al. (120) jsme i my našli vztah mezi klesající hladinou hemoglobinu a AGEs. Není zřejmé, jakým způsobem hladiny hemoglobinu ovlivňují právě produkci nebo clearance AGEs, ale podobně jako hemoglobin, tak i AGEs patří mezi markery postižení ledvin. Je známo, že anemie u pacientů s CKD je známkou zvýšeného rizika progresu renálního onemocnění, hospitalizace a předčasné smrti (121). Redukce tkáňové oxidace, která vzniká následkem anemie může vést k formaci AGEs. K bližšímu objasnění budou nutné další studie. Po adjustaci na věk a GFR byly albumin, prealbumin a negativně hemoglobin nezávislými determinanty fluoreskujících AGEs, z čehož vyplývá, že nízký hemoglobin a nízké nutriční parametry ovlivňují hladiny AGEs u pacientů s CKD. Je pravděpodobné, že AGEs by mohly přispívat k určitému riziku nutričních abnormalit a anémii spojené s renálním postižením. Naše studie byla limitovaná vzhledem k tomu, že byla pouze observační a tudíž neumožňovala sledovat jednoznačné příčiny, současně nebyl u našich pacientů stanovován příjem AGEs dietou.

Interakce AGEs a RAGE působí negativně na funkci buněk a iniciuje a podílí se na progresi patologických stavů. Poprvé byla popsána role RAGE jako receptoru pro AGEs v případě patogeneze diabetu a jeho komplikací (122), jako i v dalších pracích týkajících se pozitivní korelace se zánětlivými markery u pacientů s diabetes mellitu (123). Po definování dalších RAGE ligandů byl význam RAGE popsán i u patogeneze kardiovaskulárních onemocnění (124), či aterosklerosy (125) a celé řady dalších onemocnění (126). Z nejnovějších prací vyplývá, že AGE mediovaná exacerbace exprese RAGE, vedoucí k oxidačnímu stresu, hraje klíčovou úlohu v patogenezi vaskulárních komplikací u diabetu (127) a že sérové hladiny sRAGE a esRAGE by mohly sloužit jako universální biomarker onemocnění (128).

Zvýšení sérových hladin sRAGE související se zvýšením AGEs působí tedy jako ochrana proti toxickému působení AGEs, kdy v případě reakce AGEs s RAGE dochází k intracelulární tvorbě ROS a následně k aktivaci MAPK a NF- κ B (129; 21). Tyto děje vedou k produkci některých zánětlivých a/nebo profibrotických faktorů jako VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molekule-1), ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molekule-1), PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) a MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), které se podílí na progresi nejen aterosklerózy. V mnoha studiích byly prokázány snížené hladiny sRAGE i u dalších onemocnění jako je např. esenciální hypertenze (130), ICHS (131), revmatoidní artritida (132) či karcinom prsu a pankreatu (133; 134).

Z prvních prací, zabývajících se tímto tématem vyplývá, že určitý vliv poruchy funkce ledvin na hladiny sRAGE existuje, ale pacienti s onemocněním ledvin byli z těchto studií vyloučeni (131; 132). Jak již bylo výše zmíněno, běžnou součástí chronické renální insuficience je právě zánětlivá reakce a oxidační stres (135; 136). V naší práci bylo poprvé prokázáno, že hladiny sRAGE se zvyšují u pacientů se sníženou renální funkcí nezávisle na příčině renálního onemocnění. Ani v současné době není mnoho prací týkajících se AGEs či RAGE u jednotlivých nefropatií. Sérové hladiny sRAGE se zvyšují především u pacientů s konečným renálním selháním (bez rozdílů mezi hemodialyzovanými a peritoneálně dialyzovanými pacienty). Podobné výsledky byly potvrzeny i v pozdějších pracích (137). Ve studii Kalousová et al z roku 2007 bylo vyšetřeno 261 chronicky hemodialyzovaných pacientů, sérové koncentrace sRAGE byly ve srovnání s kontrolami významně zvýšené, hodnoty korelovaly s reziduální diurézou, fibrinogenem, orosomukoidem a počtem leukocytů. Nebyla zde nalezena korelace s DM, KV onemocněním, nutričním stavem a mortalitou.

Z výsledků práce vyplývá, že elevované hladiny sRAGE jsou následkem snížené renální funkce, jako velmi silnou determinantou pro hladiny sRAGE a inversně korelují se zánětem, nejvyšší hladiny sRAGE jsou ovlivněny geneticky (138).

K filtraci sRAGE dochází pravděpodobně (alespoň částečně) renálními glomeruly a poté prochází renálními tubuly. U pacientů s těžkou proteinurií bylo sRAGE prokázáno také v moči. Role renálních tubulů v metabolismu sRAGE byla prokázána Chengem a spol (139), který popsal jeho přítomnost v renálních tubulech a renálním tubulárním luminu (86). Fyziologická exprese RAGE byla nalezena také na podocytech, ale ve velmi nízké koncentraci, nebyla však pozorována na ostatních glomerulárních buňkách. Bylo pozorováno, že dochází k upregulaci exprese RAGE u glomerulárních podocytů například v případě diabetické nefropatie (86). Byl zjištěn protektivní efekt blokády RAGE modulací AT2 receptoru u diabetické nefropatie (140).

Z experimentálních dat jsou hladiny sRAGE spojené také s hypertrofií levé komory a myokardiálním poškozením. Observační studie u pacientů se srdečním selháním podporují hypotézu, že sRAGE zmírňují progresi srdečního onemocnění a sRAGE tedy může být počítán mezi nepřímé markery hypertrofie levé komory u pacientů s chronickým onemocněním ledvin (141). Pomocí inhibice RAGE mediované zánětlivé odpovědi má solubilní RAGE protektivní vliv nejen na rozvoj aterosklerotických vaskulárních komplikací (142). PAPP-A (Pregnancy associated plasma protein) podobně jako sRAGE jsou v současné době novými biomarkery související s kardiovaskulárním onemocnění i u pacientů s chronickým onemocněním ledvin (143). Zvýšené hladiny sRAGE byly také sledovány v případě fyziologického či patologického těhotenství a u mnoha dalších stavů (144).

Naopak EN-RAGE přispívá ke zvýšené aterogenezi jako prozánětlivá liganda pro RAGE. Byla prokázána korelace markerů zánětu s hladinami S100A12 (EN-RAGE). S100A12 indukuje vaskulární zánět, vedoucí k aterosklerose a jeho koncentrace u pacientů s chronickým onemocněním ledvin je zvýšená (145). Byla také prokázána nadměrná exprese genu pro S100A12 v periferních leukocytech u uremických pacientů, především u těch s přítomným kardiovaskulárním onemocněním (146). Zvýšení sérových hladin EN-RAGE nebylo pozorováno u pacientů se sníženou renální funkcí v klinicky stabilním stavu bez známek infekce, na rozdíl od pacientů se sníženou renální funkcí a subklinickým zánětlivým stavem (147). Další práce ukazuje, že u hemodialyzovaných pacientů je EN-RAGE zvýšeno pouze mírně, ale velmi úzce souvisí s mortalitou z důvodu infekce u HD pacientů (148).

Je známo, že prevalence malnutrice u hemodialyzovaných pacientů je vysoká a souvisí s mortalitou těchto pacientů (149). U peritoneálně dialyzovaných pacientů dochází k tvorbě degradačních produktů glukosy (GDP), které ovlivňují tvorbu AGEs a použití roztoků s nižší koncentrací glukosy vede ke sníženým sérovým hladinám EN-RAGE s opačným efektem na sRAGE (150).

EN-RAGE je přítomen i v moči a jejich hladiny jsou ve srovnání se sérovými hladinami vyšší a koreluje s renální funkcí (147).

Kromě výše zmíněných je významný podíl účasti EN-RAGE na dalších patologických stavech (151) a nejnovější práce dokonce popisují i tzv. RAGE indukovaná onemocnění (152).

Pozornost je již dlouhodobě zaměřena na RAGE polymorfismy, které byly studovány především v souvislosti s diabetickými komplikacemi u pacientů s diabetes mellitus 1. a 2. typu (153; 154). Gen pro RAGE (AGER – gene encoding RAGE) je lokalizován na chromozomu 6p21.3 a je tvořen 11 exony (155). Některé studie se zaměřují na genetický původ RAGE a ukazují, že určité genové polymorfismy mají význam v patogenezi mnoha patologických stavů, jako již u opakovaně zmiňovaného zesílení zánětlivé odpovědi (156) či aterosklerosy (157). Na chromozomu 6p21.2 je lokalizován gen pro glyoxalázu, tvořený 6 exony (158). Glyoxalasa 1 metabolizuje především glyoxal a methyl glyoxal (prekurzory AGEs). Jeho snížená aktivita vede ke zvýšené formaci AGEs a tudíž i k poškození tkání. V jedné práci popsáno, že cirkulující RAGE koreluje inverzně s aterosklerosou u pacientů s CKD (159) a byl popsán i vliv polymorfismu genu pro GLO I na vaskulární komplikace u chronicky hemodialyzovaných pacientů (160). Vztah mezi RAGE a GLO polymorfismy má vliv na prognózu hemodialyzovaných pacientů (161). Dále bylo zjištěno, že polymorfismus vedoucí k substituci thyminem za adenin (T/A) v pozici -374 genového promotoru RAGE by mohl být spojen s rychlejší progresí CKD (162). Oxidativní stres, diabetes, pohlaví a dialyzační metoda u pacientů s CKD má vliv na zvýšené poškození DNA a chromozomů (163). Vztah selektovaných genových polymorfismů RAGE u pacientů 12 měsíců po transplantaci ledvin nalezen nebyl (164). V jedné práci byl pozorován vliv polymorfismu RAGE asociovaný se závažným průběhem onemocnění a odpovědí na léčbu lupusové nefritidy (165).

5.2. Experimentální studie

Selhání funkce podocytů se podílí na rozvoji glomerulosklerózy, která je pozorována u celé řady progredujících renálních onemocnění (166). Pokusy na laboratorních zvířatech jsou nákladné a z mnoha důvodů náročné, pominout nelze ani diskutovanou etickou stránku. V některých případech také není výhodné dělat pokus na celém organismu, orgánu či tkáni, ale je třeba zkoumat vlastnosti pouze určitého typu buněk. V posledních desetiletích si proto nelze základní medicínský výzkum bez tkáňových kultur představit. Přehledný souhrnný článek, který byl věnován výhradně kultivačním metodám podocytů pochází z roku 1996 (167). Od té doby se objevila celá řada nových informací a novelizujících technologických postupů v této oblasti. V práci Mundela a spol (60) je poprvé popsáno, že podocyty mohou úspěšně diferencovat *in vitro*. Současně zde bylo prokázáno, že podocyty se mohou v kulturách objevit ve dvou různých formách, a že dochází k přímé konverzi nediferencovaných „cobblestone cells“ přes intermediární fenotypy do „arborizovaných“ buněk, jako pokročile diferencovaného stavu (ale ne konečné diferenciace, protože zde chybí podocalyxin a 51-kDa „slit-membrane“ asociovaný protein). Dle Mundela a spol je konverze do arborizovaných buněk indukovatelná zabráněním subkultivace „cobblestones“ (60). Toto pozorování bylo užitečné především pro snadnější přípravu kultur zralých podocytů pro pokusy *in vitro*. Předpokládá se, že „sieving“ technikou se oddělí parietální vrstva glomerulárních buněk, čímž se odkryjí viscerální glomerulární buňky (podocyty) a je umožněno jejich rozrůstání. Někteří autoři zpochybňují stejnorodost glomerulárních buněčných kultur při této klasické přípravě (61) a proto získávali glomeruly pouze pomocí dvou sítok, s velikostí pórů 250 a 75 μm , aby nedošlo k poškození podocytů během „sieving“ procesu (62). Tato metoda byla tedy provedena bez jakéhokoliv mechanického působení na glomeruly a dekapsulované a enkapsulované glomeruly byly jednotlivě separovány pod mikroskopem. Tento postup je však velmi zdlouhavý, neboť autoři pozorovali vysoký stupeň rozrůstání z dekapsulovaných glomerulů (z přibližně 25% z nich) ve srovnání s izolací obvyklými „sieving“ metodami popsány výše. Popsali také různé typy buněk v závislosti na tom, zda byly získány z dekapsulovaných či enkapsulovaných glomerulů. Dekapsulované glomeruly vytvořily dlouhé „arborizované“ buňky s profilem markerů typickým pro podocyty *in vivo* (pozitivní pro WT-1, synaptopodin a podocalyxin). Na druhou stranu buňky z enkapsulovaných glomerulů vytvářely dva morfologické typy buněk: polygonální „cobblestone-like“ buňky lokalizované v centru kolonie a dlouhé nepravidelně tvarované buňky na periferii kolonie. „Cobblestones“ byly pozitivní na WT-1 ale zabarvily se slaběji

než „arborizované“ buňky, byly také pozitivní na synaptopodin a negativní na podocalyxin. Dlouhé nepravidelně tvarované buňky byly velmi slabě pozitivní na synaptopodin a negativní na podocalyxin. Bylo tedy pravděpodobné, že buňky vyrůstající z dekapulovaných glomerulů jsou podocyty, zatímco polygonální buňky z enkapsulovaných glomerulů jsou získány z parietálních epiteliálních buněk a část z nich (dlouhé nepravidelně tvarované elementy) modifikují jejich fenotyp tak aby se podobaly podocytům in vitro. V naší práci jsme získávali glomeruly „sieving“ metodou s použitím 3 sítok o velikosti pórů 250, 150 a 75 μ m a získali jsme tedy především dekapulované glomeruly, z nichž vyrůstali „cobblestones“ a následně i arborizované buňky. Přítomnost enkapsulovaných glomerulů se při této metodě vyloučit nedala.

Dalším důležitým aspektem v propagaci a diferenciaci podocytů je povrch kultivačních nádob s vazebnými faktory. Většinou byly podocyty udržovány v kultivačních nádobách pokrytých kolagenem typu I, jednoduše vzhledem ke komerčním účelům. Přirozenou součástí GBM je kolagen typu IV, laminin, nidogen a heparin sulfát proteoglykan, avšak hlavní strukturální protein glomerulární bazální membrány je kolagen typu IV (168). Imunocytochemicky jsme stanovovali znaky podocytů tehdy, jakmile na námi používaném kolagenu typu I dosahovaly konfluency a relativně rychle proliferovaly ve srovnání s plastickým povrchem. Podobně tomu bylo i v jiné práci, kde popsali, že proteiny extracelulární matrix jako např. kolagen I nebo IV usnadňují proliferaci indukovanou EGF a ostatními růstovými faktory u kultivovaných podocytů (169). Po pěti dnech růstu exprimovaly běžné podocytární znaky jako WT-1, stejně jako znak diferencovaných podocytů např. synaptopodin.

Primární kultury podocytů získané z myších nebo lidských ledvin vykazují parciální diferenciaci in vitro spojenou se zástavou růstu, proto bylo specifickým cílem podocytárního výzkumu vytvořit linii podocytárních buněk, která si udrží potenciál pro proliferaci a diferenciaci. První dlouhodobě kultivovaná imortalizovaná buněčná linie glomerulárních epiteliálních buněk (podocytů) byla založena společně s liniemi mezangiálních a glomerulárních endoteliálních buněk z myši transgenní pro počáteční oblast SV40 (kódující TAg) (170). Hlavní problémy spojené s touto linií, stejně jako u ostatních irreverzibilně imortalizovaných buněčných linií vytvořených později (171) byly ty, že buňky proliferovaly, ale bez tendence diferencovat. V těchto studiích byly proliferující a diferencující buňky drženy v mediu RPMI 1640 obohaceném o 10% FCS.

K propagaci buněk byla požadována teplota 33°C a přítomnost INF- γ v kultivačním mediu (permissivní podmínky). Buněčná diferenciace byla indukována po přidání INF – γ do kompletního media při teplotě 37-39°C. Díky daru z mnichovského pracoviště jsme mohli pracovat i s těmito buněčnými liniemi podocytů. Je však třeba si uvědomit, že tyto buňky reprezentují především experimentální model s vysokým stupněm možnosti vzniku artefaktů.

Velmi důležitou známkou aktivity glomerulárního onemocnění je detekce proteinurie, ale takto nelze odlišit mezi dlouhodobějším a právě probíhajícím poškozením. Močové podocyty byly popsány jako marker přítomnosti závažného glomerulárního postižení a současně jako prediktor progresu onemocnění. Podocyty a jeho části se tedy za určitého patologického stavu (např. autoimunitním zánětu) dostávají do močového prostoru a jsou vylučovány močí (172). Kromě toho podocyt v této situaci reaguje zvýšením syntézy proteinů, nukleových kyselin, ale i např. podocalyxinu. Jejich množství v moči je přímo úměrné tíži postižení a jejich kvantifikace umožňuje predikovat akutní glomerulární lézi (70).

Viabilita močových podocytů byla potvrzena jejich schopností růst v kultuře. Kultivované močové podocyty exprimovali kromě podocalyxinu, synaptopodinu, podocinu, P-cadherinu a GLEPP 1 i cytokeratin 8 a dokonce i WT1 nebo podocin. Je zajímavé, že většina buněk exprimovala WT1 pouze po několika týdnech kultivace, proto jsme nakonec antiWT1 v naší práci nepoužili. Kultivované močové buňky rostly rychle do rozsáhlých kolonií, vytvářely „cobblestone“ morfologii a později postoupily krizi, což je zdůvodněno jejich pokročilejší diferenciací. Buňky z moči pacientů s aktivním glomerulárním onemocněním rostly rychleji a proliferovaly, než postoupily krizi a dokonce vyvinuly primární a sekundární výběžky, zatímco podocyty zdravých osob rostly v menších koloniích, v kultuře umíraly dříve a nebylo možné je pasážovat (173; 174). Tato metoda je jistě mnohem přesnější a důkladnější, každopádně vzhledem k náročnosti kultivace podocytů by se nejednalo o co nejjednodušší a nejrychlejší metodu, což bylo naším primárním cílem.

Podocyty v moči je tedy možné identifikovat díky expresi specifických markerů. Nejvhodnějším markerem identifikace podocytů v moči se zdá být podocalyxin, který je lokalizován na apikálním povrchu buňky (70). Podocalyxin je exprimován i na dalších buňkách jako jsou vaskulární endoteliální buňky, destičky a hematopoetické buňky (175). V některých pracech byly používány i další markery podocytů, které mají odlišnou subcelulární lokalizaci, v apikální části podocytů jako podocalyxin, a to GLEPP 1 a anti CR-1, v oblasti slit diaphragm nephrin, ZO-1 a v bazální části anti-alfa3 integrin. V močovém sedimentu pacientů nebyly anti-nephrin, anti ZO-1 ani anti-alfa3 integrin prokázány, což by

mohlo nasvědčovat tomu, že pouze apikální část podocytární buněčné membrány se dostává do moče (176). Bylo též prokázáno, že podocyty byly nalezeny v moči nejen pacientů s glomerulárním onemocněním, ale také u zdravých kontrol (173; 67). Naopak v jiné práci podocyty v moči u zdravých osob, pacientů s tubulointersticiální nefritidou nebo nezánettivým renálním onemocněním nalezeny nebyly (177; 178), stejně jako při vyšetření naší kontroly. Podocyty v moči nebyly v jiné práci také detekovány u pacientů s chronickým selháním ledvin (179). Podocyty jsou významně poškozeny u mnoha forem glomerulárního onemocnění, například minimálních změn, FSGS, membránózní nefropatie, diabetické nefropatie a lupusové nefritidy (180).

Ke stanovování podocytů v moči jsme využívali metody průtokové cytometrie, jejímž parametrem může být fyzikální nebo chemická vlastnost buňky (granularita, velikost, životnost a další) a vše, co je možné označit monoklonální protilátkou (povrchové molekuly, intracelulární molekuly apod). Již v preanalytické fázi se při naší práci objevily jisté problémy, především vzorky moče, které obsahovaly odloupané epiteliie z močové trubice v množství překrývajícím všechny ostatní elementy, byly pro zpracování nevhodné. Dlouhým stáním se v moči dále pomnožily bakterie, které štěpí ureu na amoniak, v takto vzniklém alkalickém prostředí se všechny elementy rychle rozpadaly. Evropská direktiva pro vyšetřování močí sice připouští až 4 hodinové stání močí před analýzou za předpokladu, že moč je vychlazená na 4 °C, ale pro naše potřeby nebylo možné tento postup použít především z důvodu rizika vysrážení solí. Zahájili jsme přípravu močového sedimentu klasickou separací dle Maška, nedošlo však k dokonalému oddělení buněk sedimentu od jiných (nebuněčných) součástí, které vykazovaly značnou autofluorescenci interferující s fluorochromem značenými buňkami. Dalším problémem byla zřejmě nespecifická vazba použitých protilátek na proteiny v moči nemocných s proteinurií. Pro velkou přítomnost drtě, krystalů, hlenu, bakterií a jiné nežádoucí příměsi byl obraz získaného sedimentu velmi nepřehledný, neumožňující přesnější gatování. Abychom omezili vliv výše uvedených faktorů, pokusili jsme se o specifitější separaci sedimentu a použili jsme speciální separační zkumavky, určené ke gradientové separaci buněk epiteliálního původu (buněk metastazujících solidních tumorů) z periferní krve. Vycházeli jsme z toho, že i podocyt je buňka epiteliálního původu a že výsledkem této separace močí by mohla být buněčná suspenze obsahující pouze epiteliální buňky. Tato separace byla úspěšná, získané buňky měly na průtokovém cytometru poměrně homogenní granularitu, byly různě velké a nespecifická izotypová kontrola byla uspokojivá.

V novějších pracech bylo popsáno, že moč pacientů s glomerulonefritidami kromě podocytů obsahuje též podocytární fragmenty (tzv. PPGS –podocalyxin positive granular structure), které rovněž reflektují stupeň podocytárního poškození. PPGS jsou taktéž pozitivní na podocalyxin, CR-1, GLEPP 1 a negativní na nephrin, ZO-1 a alfa3integrin, což opět potvrzuje, že pouze apikální část buněčné membrány podocytů je vylučována do moče. Bylo zjištěno, že močový sediment u akutního extrakapilárního glomerulárního poškození je bohatý na PPGS (176). Bylo též zjištěno, že v moči je přítomno mnohem více PPGS než podocytů jako takových a že stanovené PPGS nejsou součástí přítomných podocytů. Malý počet podocalyxin pozitivních fragmentů byl zjištěn také u kontrolní skupiny, ale u pacientů s nefrotickým syndromem a nefritidou byl signifikantně vyšší, i když u pacientů s nefritidou mnohem vyšší než u pacientů s nefrotickým syndromem. Pouze u pacientů s glomerulonefritidou byly současně detekovány močové podocyty. Následně v práci Habara a spol. byly pomocí průtokové cytometrie stanovovány všechny elementy derivované od podocytů v moči a pojmenovány podocalyxin pozitivní elementy (PCS + el.) Tyto elementy byly signifikantně vyšší u pacientů s aktivní glomerulonefritidou v porovnání s pacienty v dlouhodobé remisi a zdravou kontrolou (181). Nenašli zde korelaci mezi PCX + el. a proteinurií, erytrocyturií a renální funkcí, zatímco s histologickými změnami v renální biopsii korelovaly PCX + el. v moči velmi úzce (182).

Na rozdíl od proteinurie, která informuje spíše o míře poškození filtrační membrány, podocyturie přetrvává i po odeznění patologického působení, vzhledem k tomu, že je přítomen defekt ve filtrační membráně. Podocyturie je tedy citlivým indikátorem aktivity onemocnění (183). V naší práci jsme ač u malého počtu pacientů citlivost podocyturie ve vztahu k aktivitě onemocnění prokázali. Užití této metody má celou řadu výhod – není invazivní a vyšetření je možné opakovat dle potřeby a bez zatížení pacienta.

6. Závěr

6.1. Klinicko-laboratorní studie

6.1.1. AGEs u nefropatií s mírnou renální insuficiencí

Nepozorovali jsme signifikantní zvýšení sérových hladin AGEs u pacientů s různými typy nefropatií a s normální nebo mírně zvýšenou hladinou kreatininu, nenalezli jsme také signifikantní rozdíly v sérových hladinách AGEs mezi jednotlivými typy nefropatií, i když mají rozdílnou patogenezi. Hladina AGEs závisí více na renální funkci než na typu nefropatie.

6.1.2. Asociace AGEs s nutričními parametry a anémií u pacientů s chronickým onemocněním ledvin

Hlavním zjištěním byla pozitivní korelace hladin albuminu a prealbuminu a negativní korelace hemoglobinu se sérovými hladinami AGEs u pacientů s CKD ve stádiu 1-5, s různými typy nefropatií, bez nutnosti náhrady funkce ledvin. Rozdíly mezi sérovými hladinami AGEs u pacientů s CKD a DM, či bez něj jsme nenalezli. Pozorovali jsme, že nízký hemoglobin a nutriční parametry významně ovlivňují sérové hladiny AGEs u pacientů s CKD. Vztah mezi sérovými hladinami AGEs a CRP u pacientů s CKD nalezen nebyl, pravděpodobně vzhledem k výrazné inter-individuální variabilitě, ale prokázali jsme současné zvýšení sérových hladin AGEs a orosomukoidu (potvrzujícího faktoru mikrozánětu) se snižující se renální funkcí.

6.1.3. Vliv funkce ledvin na hladiny sRAGE u pacientů s chronickým onemocněním ledvin

Poprvé jsme prokázali, že sérové hladiny sRAGE se zvyšují u pacientů se sníženou renální funkcí nezávisle na příčině renálního onemocnění a že hladiny sRAGE stoupají s renálním poškozením, a jsou nejvyšší u pacientů s renálním selháním.

6.2. Experimentální studie

6.2.1. Kultivace podocytů

Kultivace podocytů s možností jejich dalšího využití v pokusech je velmi důležitou součástí výzkumu onemocnění ledvin. Podařilo se nám nalézt a osvojit si techniky a postupy kultivace nejen primokultur, ale i imortalizovaných podocytů, které jsme následně pozorovali mikroskopicky a identifikovali imunocytochemicky.

6.2.2. Detekce podocytů v moči u pacientů s onemocněním ledvin

Z našich vyšetření vyplývá, že podocyturie souvisí s proteinurií, ale jednoznačně s ní nekoreluje. Je významně ovlivněna aktivitou onemocnění, odráží tedy závažnost glomerulárního patologického procesu a současně je ovlivněna dobou trvání diagnosy. Ztráta podocytů do moči je limitována dlouhodobým onemocněním, vzhledem k poklesu celkového počtu podocytů v ledvinách.

Bibliografie

1. **Štípek S, a kol.** Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Praha, Grada, Avicenum, 2000.
2. **Draper HH, McGirr LG, Hadley M.** The metabolism of malondialdehyde. *Lipids*. 1986 Apr;21(4):305-7.
3. **Morrow JD.** The isoprostanes: Their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. *Drug Metab Rev*. 2000;32:377–385.
4. **Traverso N, Menini S, Maineri EP, Patriarca S, Odetti P, Cottalasso D, Marinari UM, Pronzato MA.** Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004 Sep;59(9):B890-5.
5. **Maillard LC.** C.R. Seances Acad. Sci. 154, 66, 1912.
6. **Obšil T, Pavlíček Z.** Glykace proteinů a fosfolipidů: Maillardova reakce in vivo. *Chem. Listy* 91;558-569 (1997).
7. **Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR.** The advanced glycation end product, N epsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem*. 1996 Apr 26;271(17):9982-6.
8. **Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Bucala R.** Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J Biol Chem*. 1992 Mar 15;267(8):5133-8.
9. **Wells-Knecht KJ, Brinkmann E, Wells-Knecht MC, Litchfield JE, Ahmed MU, Reddy S, Zyzak DV, Thorpe SR, Baynes JW.** New biomarkers of Maillard reaction damage to proteins. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11 Suppl 5:41-7.
10. **Semba RD, Ang A, Talegawkar S, et al.** Dietary intake associated with serum versus urinary carboxymethyl-lysine, a major advanced glycation end product, in adults: the Energetics Study. *Eur J Clin Nutr*. 2012 Jan;66(1):3-9.
11. **Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G.** Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Oct;289(4):F645-59.
12. **Thornalley PJ.** Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol*. 1996 Jun;27(4):565-73.
13. **Kalapos MP.** Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol Lett*. 1999 Nov 22;110(3):145-75.
14. **Westwood ME, Argirov OK, Abordo EA, Thornalley PJ.** Methylglyoxal-modified arginine residues--a signal for receptor-mediated endocytosis and degradation of proteins by monocytic THP-1 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Mar 27;1356(1):84-94.
15. **Nemet I, Turk Z, Duvnjak L, Car N, Varga-Defterdarovic L.** Humoral methylglyoxal level reflects glycemic fluctuation. *Clin Biochem*. 2005 Apr;38(4):379-83.
16. **Vlassara H.** The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes*

Metab Res Rev. 2001 Nov-Dec;17(6):436-43.

17. **Kalousová M.** Patobiochemie ve schématech. 1. Vyd. Praha: Grada, 2006.

18. **Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM.** Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 May;4(5):285-93.

19. **Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A.** Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem.* 1992 Jul 25;267(21).

20. **Srikrishna G, Huttunen HJ, Johansson L, Weigle B, Yamaguchi Y, Rauvala H, Freeze HH.** N -Glycans on the receptor for advanced glycation end products influence amphotericin binding and neurite outgrowth. *J Neurochem.* 2002 Mar;80(6):998-1008.

21. **Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM.** The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Dec 20;1498 (2-3):99-111. Review.

22. **Herold K, Moser B, Chen Y, et al.** Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in a dash to the rescue inflammatory signals gone away in the primal response to stress. *Leukoc Biol* 2007;82, 204-212.

23. **Demling N, Ehrhardt C, Kasper M, Laue M, Knels L, Rieber E.** Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell and Tissue Research* 2006;323:475-488.

24. **Yan S, Ramasamy R, Schmidt A.** Receptor for AGE (RAGE) and its ligands—cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. *Journal of Molecular Medicine* 2009, 87:235-247.

25. **Basta G.** Atherosclerosis. 2008;196:9-21.

26. **Fritz G.** RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci.* 2011 Dec;36(12):625-32.

27. **Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, Rutledge R, Lin B, Amoscato AA, Zeh HJ, Lotze MT.** RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J Transl Med.* 2009 Mar 17;7:17.

28. **Donato R.** Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 2003;60:540-51.

29. **Pietzch J, Hoppmann S.** Human S100A12 a novel key player in inflammation? *Amino Acids* 2009;36:381-9.

30. **Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP.** Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl).* 2005 Nov;83(11):876-86. .

31. **Santilli F, Vazzana N, Bucciarelli LG, Davi G.** Soluble forms of RAGE in human diseases: clinical end therapeutical implications. *Curr Med Chem.* 2009;16(8):940-52.

32. **Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P, Bianchi ME.** A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J.* 2008 Oct;22(10):3716-27.
33. **Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP.** AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res.* 1998 Mar;37(3):586-600.
34. **Khalifah RG, Baynes JW, Hudson BG.** Amadorins: Novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem. And Biophysical Res Commun.* 1999;257, p.251-258.
35. **Peng X, Ma J, Chen F, Wang M.** Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. *Food Funct.* 2011 Jun;2(6):289-301.
36. **Edeas M, Attaf D, Mailfert AS, Nasu M, Joubet R.** Maillard reaction, mitochondria and oxidative stress: potential role of antioxidants. *Pathol Biol (Paris).* 2010 Jun;58(3):220-5.
37. **Vladimír Tesař, Oto Schuck a kolektiv.** *Klinická nefrologie*, GRADA Publishing, 2006.
38. **Couser WG.** Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 1998; 13 Suppl 1:10-5. Review.
39. **Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, Hagen EC, Hoffman GS, Hunder GG, Kallenberg CG, et al.** Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum.* 1994 Feb;37(2):187-92.
40. **Booth AD, Pusey CD, Jayne DR.** Renal vasculitis -- an update in 2004. *Nephrol Dial Transplant.* 2004 Aug; 19(8):1964-8.
41. **Tesar V, Hruskova Z.** ANCA-associated renal vasculitis – an update. *Contrib Nephrol.* 2013;181:216-28.
42. **Orth SR, Ritz E.** The nephrotic syndrome. *N Engl J Med.* 1998 Apr 23;338 (17):1202-11.
43. **Waldman M, Crew RJ, Valeri A, Bush J, Stokes B, Markowitz G, D'Agati V, Appel G.** Adult minimal-change disease: clinical characteristics, treatment, and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007 May;2(3):445-53.
44. **Burgess E.** Management of focal segmental glomerulosclerosis: evidence-based recommendations. *Kidney Int Suppl.* 1999 Jun;70:S26-32.
45. **Muirhead N.** Management of idiopathic membranous nephropathy: evidence-based recommendations. *Kidney Int Suppl.* 1999 Jun;70:S47-55.
46. **Reich HN, Troyanov S, Scholey JW, Cattran DC a Registry, Toronto Glomerulonephritis.** Remission of proteinuria improves prognosis in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Dec;18(12):3177–83.
47. **Donadio JV, Grande JP.** IgA nephropathy. *N Engl J Med.* 2002 Sep 5;347(10):738–48.
48. **Guidelines for Screening, Treatment, and Management of Lupus Nephritis.** American College of Rheumatology Arthritis Care & Research Vol. 64, No. 6, June 2012, pp

797–808.

49. **Ritz E, Rychlik I, Locatelli F, Halimi S.** End-stage renal failure in type 2 diabetes: a medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis.* 1999 Nov;34(5):795-808.

50. **National Kidney Foundation.** Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification *Am. J. Kidney Dis.*, 2002, 39 (Suppl. 1), p. S1-S266.

51. **Ronco PM, Aucouturier P, Moulin B.** Renal amyloidosis and glomerular diseases with monoklonal immunoglobulin deposition. In: Johnson RJ, Feehally J. *Comprehensive clinical nephrology.* Edinburgh: Mosby 2000, p. 31.1-31.14.

52. **Fabrizi F, Plaisier E, Saadoun D, Martin P, Messa P, Cacoub P.** Hepatitis C virus infection, mixed cryoglobulinemia, and kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2013 Apr;61(4):623-37.

53. **Kittnar O a kol.** Lékařská fyziologie, Grada Publishing a.s., 2011.

54. **Pavenstädt H.** Roles of the podocyte in glomerular function. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:F173-F179.

55. **Shirato I, Hosser H, Kimura K, Sakai T, Tomino Y, Kriz.** The development of focal segmental glomerulosclerosis in Masugi nephritis is based on progressive podocyte damage. *Virchows Arch* 1996;429:255-273.

56. **Krakower CA, Greenspon SA.** Factors leading to variation in concentration of nephrotoxic antigen(s) of glomerular basement membrane. *AMA Arch Pathol* 1954;58:401-432.

57. **Burlington H, Cronkite EP.** Characteristics of cell cultures derived from renal glomeruli. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973;142:143-149.

58. **Kreisberg JI, Hoover RL, Karnovsky MJ.** Isolation and characterisation of rat glomerular epithelial cells in vitro. *Kidney Int* 1978;14:21-30.

59. **Johnson R, Yamabe H, Chen YP, Campbell C, Gordon K, Baker P, Lovett D, Couser WG.** Glomerular epithelial cells secrete a glomerular basement membrane-degrading metalloproteinase. *J Am Soc Nephrol* 1992;2:1388-1397.

60. **Mundel P, Reiser J, Kriz W.** Induction of differentiation in cultured rat and human podocytes. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:697-705.

61. **Weinstein T, Cameron R, Katz A, Silverman M.** Rat glomerular epithelial cells in culture express characteristics of parietal, not visceral, epithelium. *J Am Soc Nephrol* 1992;3:1279-1287.

62. **Yaoita E, Kurihara H, Sakai T, Ohsiro K, Yamamoto T.** Phenotypic modulation of parietal epithelial cells of Bowman's capsule in culture. *Cell Tissue Res.* 2001 Jun;304(3):339-49.

63. **Jat PS, Sharp PA.** Large T antigens of simian virus 40 and polyomavirus efficiently establish primary fibroblasts. *J Virol* 1986;59:746-750.

64. **Frederiksen K, Jat PS, Valtz N, Levy D, McKay R.** Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron* 1988;1:439-448.
65. **Petit CA, Gardes M, Feunteun J.** Immortalization of rodent embryo fibroblasts by SV40 is maintained by the A gene. *Virology* 1983;127:74-82.
66. **Baldwin AS Jr, Sharp PA.** Binding of a nuclear factor to a regulatory sequence in the promoter of the mouse H-2Kb class I major histocompatibility gene. *Mol Cell Biol* 1987;7:305-313.
67. **Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV.** Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F40-F48.
68. **Mundel P.** Urinary podocytes: lost and found alive. *Kidney Int* 2003;64:1529-1530.
69. **Pascual M, Steiger G, Sadallah S, Paccaud JP, Carpentier JL, James R, Schifferli JA.** Identification of membrane-bound CR1 (CD35) in human urine: evidence for its release by glomerular podocytes. *J Exp Med* 1994;179:889-899.
70. **Hara M, Yamamoto T, Yanagihara T, Takada T, Itoh M, Adachi Y, Yoshizumi A, Kawasaki K, Kihara I.** Urinary excretion of podocalyxin indicates glomerular epithelial cell injuries in glomerulonephritis. *Nephron* 1995;69:397-403.
71. **Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, Koide H.** Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1379-1384.
72. **Henle T, Deppisch R, Beck W, Hergesell O, Hansch G, Ritz E.** Advanced glycated end- products (AGE) during hemodialysis treatment: discrepant results with different methodologies reflecting the heterogeneity of AGE compounds. *Nephrol. Dial. Transplant* 14, 1999;1968-1975.
73. **Münch G, Kies R, Wessel A, Riederer P, Bahner U et al.** Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997 Sep;35(9):669-77.
74. **Lakowitz, J. R.** Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3.vyd. Springer.
75. **Kalousová M, Zima T, Tesař V, Škrha J, Štípek S.** Stanovení produktů pokročilé glykace a oxidace. *Klin. Biochem. Metab.*, 10(31), 2002, No. 1,p. 11-16.
76. **Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D.** A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med.* 1999;130:461-470.
77. **Pia de la Maza M. Garrido F, Escalante N et al.** Fluorescent advanced glycation end products (ages) detected by spectro-photofluorimetry, as a screening tool to detect diabetic microvascular complications. *Journal of Diabetes Mellitus*, 2012,No 2,221-226.
78. **Asano M, Fujita Y, Ueda Y, Suzuki D, Miyata T, Sakai H, Saito A.** Renal proximal tubular metaobilsism of protein-linked pentosidne, an advanced glycation end product. *Nephron.* 2002 Aug;91(4):688-94.

79. **Deuther-Conrad W, Franke S, Sommer M, Henle T, Stein G.** Differences in the modulating potential of advanced glycation end product (AGE) peptides versus AGE proteins. *Kidney Int Suppl.* 2001 Feb;78:S63-6.
80. **Gugliucci A, Bendayan M.** Reaction of advanced glycation endproducts with renal tissue from normal and streptozocin-induced diabetic rats: an ultrastructural study using colloidal gold cytochemistry. *J Histochem Cytochem.* 1995 Jun;43(6):591-600.
81. **Horie K, Miyata T, Maeda K, et al.** Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest.* 1997;100:2995-3004.
82. **Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S, Miyazaki T, Ishizaki Y, Hayase F, Tatemichi N, Takei Y.** Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidney and aortas of diabetic patients. *J Clin Invest.* 1997 Mar 15;99(6):1272-80.
83. **Golej J, Hoeger H, Radner W, Unfried G, Lubec G.** Oral administration of methylglyoxal leads to kidney collagen accumulation in the mouse. *Life Sci.* 1998;63(9):801-7.
84. **Hartog JW, Smit AJ, van Son WJ, et al.** Advanced glycation end products in kidney transplant patients: a putative role in the development of chronic renal transplant dysfunction. *Am J Kidney Dis.* 2004;43:966-975.
85. **Berrou J, Tostivint I, Verrecchia F, et al.** Advanced glycation end products regulate extracellular matrix protein and protease expression by human glomerular mesangial cells. *Int J Mol Med.* 2009;23:513-520.
86. **Tanji N, Markowitch G, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM, d'Agati V.** Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Sep;11(9):1656-66.
87. **Suzuki D, Miyata T, Saotome N, Horie K, Inagi R, Yasuda Y, Uchida K, Izuhara Y, Yamage M, Sakai H, Kurokawa K.** Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesion. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Apr;10(4):822-32.
88. **Ishibashi Y, Yamagishi S, Matsui T, Ohta K, Tanoue R, Ueda S, Nakamura K, Okuda S.** Pravastatin inhibits advanced glycation end products (AGEs)-induced proximal tubular cell apoptosis and injury by reducing receptor for AGEs (RAGE) level. *Metabolism.* 2012 Aug, 61(8):1067-72.
89. **Loughrey CM, Young IS, Lightbody JH et al.** Oxidative stress in haemodialysis. *QJM.* 1994 Nov;87(11):679-83.
90. **Vanholder R, Argiles A, Baurmeister U, et al.** Uremic toxicity: Present state of the art. *Int J Artif Organs.* 2001 Oct;24(10):695-725.

91. **Kalousova M, Zima T, Tesar V, Lachmanova J.** Advanced glycation end products and advanced oxidation protein products in hemodialyzed patients. *Blood Purif.* 2002;20(6):531-6.
92. **Miyata T, Ueda Y, Shinzato T, Iida Y, Tanaka S, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Maeda K.** Accumulation of albumin-linked and free-form pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine. *J Am Soc Nephrol.* 1996 Aug;7(8):1198-206.
93. **Stein G, Franke S, Mahiout A, Schneider S, Sperschneider H, Borst S, Vienken J.** Influence of dialysis modalities on serum AGE levels in end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2001 May;16(5):999-1008.
94. **Miyata T, Ueda Y, Yamada Y, Saito A, Jadoul M, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K.** Carbonyl stress in uremia: accumulation of carbonyls accelerate the formation of pentosidine, an advanced glycation end product. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Dec;9(12):2349-56.
95. **Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C.** Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications. *Kidney Int Suppl.* 2000 Aug;76:S120-5.
96. **Roberts MA, Thomas MC, Fernando D, Macmillan N, Power DA, Ierino FL.** Low molecular weight advanced glycation end products predict mortality in asymptomatic patients receiving chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:1611-1617.
97. **Franke S, Muller A, Sommer M, Busch M, Kientsch-Engel R, Stein G.** Serum levels of total homocysteine, homocysteine metabolites and of advanced glycation end products (AGEs) in patients after renal transplantation. *Clin Nephrol.* 2003 Feb;59(2):88-97.
98. **Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification.** *Am. J. Kidney Dis.*, 2002, 39 (Suppl. 1), p. S1-S266.
99. **Daroux M, Prévost G, Maillard-Lefebvre H, Gaxatte C, D'Agati VD, Schmidt AM, Boulanger E.** Advanced glycation-end products: implications for diabetic and non-diabetic nephropathies. *Diabetes Metab.* 2010;36:1-10.
100. **Heidland A, Sebekova K, Schinzel R.** Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *Am J Kidney Dis.* 2001 Oct;38(4 Suppl 1):S100-6.
101. **Kalousova M, Zima T, Tesar V, Dusilova-Sulkova S, Skrha J.** Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. *Mutat Res.* 2005 Nov 11;579(1-2):37-46.
102. **Papanastasiou P, Grass L, Rodela H, Patrikarea A, Oreopoulos D, Diamandis EP.** Immunological quantification of advanced glycosylation end-products in the serum of patients on hemodialysis or CAPD. *Kidney Int.* 1994;46:216-222.
103. **Kalousova M, Zima T, Tesar V, Sulkova S, Skrha J, Deppisch R, Beck W.** Glycoxidation in hemodialyzed patients with diabetes mellitus. In: Timio M, Wiyemann V, Venanzi, eds. *Cardionephrology.* Cosenza, Editoriale Bios, 2002, vol 7:297-300.

104. **Halliwell B.** The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*. 1993 Mar;23 Suppl 1:118-26.
105. **Kalousova M, Skrha J, Zima T.** Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res*. 2002;51(6):597-604.
106. **Chang JB1, Chu NF, Syu JT, Hsieh AT, Hung YR.** Advanced glycation end products (AGEs) in relation to atherosclerotic lipid profiles in middle-aged and elderly diabetic patients. *Lipids Health Dis*. 2011 Dec 6;10:228.
107. **Kilhovd BK, Juutilainen A, Lehto S, et al.** High serum levels of advanced glycation end products predict increased coronary heart disease mortality in nondiabetic women but not in nondiabetic men: a population-based 18-year follow-up study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:815-820.
108. **Nishizawa Y1, Koyama H, Inaba M.** AGEs and cardiovascular diseases in patients with end-stage renal diseases. *J Ren Nutr*. 2012 Jan;22(1):128-33.
109. **Riella MC.** Malnutrition in dialysis: malnourishment or uremic inflammatory response? *Kidney Int*. 2000;57:1211-1232.
110. **Caravaca F, Arrobas M, Pizarro JL, Sanchez-Casado E.** Uraemic symptoms, nutritional status and renal function in pre-dialysis end-stage renal failure patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16:776-782.
111. **Stenvinkel P, Heimbürger O, Paultre F, et al.** Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int*. 1999;55:1899-1911.
112. **Wautier JL, Schmidt AM.** Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res*. 2004;95:233-238.
113. **Semba RD, Ferrucci L, Fink JC, et al.** Advanced glycation end products and their circulating receptors and level of kidney function in older community-dwelling women. *Am J Kidney Dis*. 2009;53:51-58.
114. **Miyata T, Fu MX, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Thorpe SR, Baynes JW.** Autoxidation products of both carbohydrates and lipids are increased in uremic plasma: is there oxidative stress in uremia? *Kidney Int*. 1998;54:1290-1295.
115. **Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergström J.** Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15:953-960.
116. **Romão JE Jr, Haiashi AR, Elias RM et al.** Positive acute-phase inflammatory markers in different stages of chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2006;26:59-66.
117. **Kalousova M, Sulkova S, Fialova L, et al.** Glycooxidation and inflammation in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:2577-2581.

118. **Marečková O, Teplan V, Kalousová M, Zima T, Lecián D, Skibová J, Viklický O.** Solubilní receptor pro konečné produkty pokročilé glykace u obézních nemocných s chronickým onemocněním ledvin.
119. **Teplan V, Vyhnalek F, Gürlich R, et al.** Increased proinflammatory cytokine production in adipose tissue of obese patients with chronic kidney disease. *Wien Klin Wochenschr* 2010;122(15-16):466-473.
120. **Thomas MC, Tsalamandris C, MacIsaac R, et al.** Low-molecular-weight AGEs are associated with GFR and anemia in patients with type 2 diabetes. *Kidney Int.* 2004;66:1167-1172.
121. **McClellan WM, Flanders WD, Langston RD, Jurkovitz C, Presley R.** Anemia and renal insufficiency are independent risk factors for death among patients with congestive heart failure admitted to community hospitals: a population-based study. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:1928-1936.
122. **Vlassara H.** Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes.* 1997 Sep;46 Suppl 2:S19-25.
123. **Yoshida T, Imaizumi T.** Serum levels of sRAGE, the soluble form of receptor for advanced glycation end products, are associated with inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.Mol Med.* 2007 Mar-Apr;13(3-4):185-9.
124. **Sakaguchi T, Yan SF, Yan SD, Belov D, Rong LL, Sousa M, Andrassy M, Marso SP, Duda S, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth PP, Stern DM, Schmidt AM, Naka Y.** Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *J Clin Invest.* 2003 Apr;111(7):959-72.
125. **Basta G, Schmidt AM, De Caterina R.** Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res.* 2004 Sep 1;63(4):582-92.
126. **Hou FF, Ren H, Owen WF Jr, Guo ZJ, Chen PY, Schmidt A, Miyata T, Zhang X.** Enhanced expression of receptor for advanced glycation end products in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Jul;15(7):1889-96.
127. **Chawla D, Bansal S, Banerjee BD, Madhu SV, Kalra OP, Tripathi AK.** Role of advanced glycation end products (AGEs)-induced receptor (RAGE) expression in diabetic vascular complications. *Microvasc Res.* 2014 Sep;95:1-6.
128. **Prasad Kailash.** Low Levels of Serum Soluble Receptors for Advanced Glycation End Products, Biomarkers for Disease State: Myth or Reality. *Int J Angiol* 2014; 23(01): 011-016.
129. **Wendt T, Tanji N, Guo J , et al.** Glucose, glycation, and RAGE: implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (5) 1383-1395.
130. **Geroldi D, Falcone C, Emanuele E, et al.** Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end-products and patients with essential hypertension. *J Hypertens.*

2005 Sep;23(9):1725-9.

131. **Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, et al.** Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 May;25(5):1032-7.
132. **Pullerits R, Bokarewa M, Dahlberg L, Tarkowski A.** Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(4):R817-24.
133. **Tesarova P, Kalousova M, Jachymova M, Mestek O, Petruzzelka L, Zima T.** Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-soluble form (sRAGE) and gene polymorphisms in patients with breast cancer. *Cancer Invest.* 2007 Dec;25(8):720-5.
134. **Krechler T, Jachymova M, Mestek O, Zak A, Zima T, Kalousova M.** Soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) and polymorphisms of RAGE and glyoxalase I genes in patients with pancreas cancer. *Clin Biochem.* 2010 Jul;43(10-11):882-6.
135. **Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drueke T, Descamps-Latscha B.** Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol.* 1998 Sep 1;161(5):2524-32.
136. **Locatelli F, Canaud B, Eckhart KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zocalli C.** Oxidative stress in end-stage renal disease. An emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Jul;18(7):1272-80.
137. **Hammady MMR, Khashali SEL, Halim HA, Rashed L, Hussein M.** Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in non-diabetic hemodialysis patients and chronic kidney disease. *Med J Cairo Univ* 2012; 80: 69-75.
138. **Kalousova M, Jachymova M, Mestek O, Hodkova M, Kazderova M, Tesar V, Zima T.** Receptor for advanced glycation end products--soluble form and gene polymorphisms in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Jul;22(7):2020-6.
139. **Cheng C, Tsuneyama K, Kominami R, et al.** Expression profiling of endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in human organs. *Mod Pathol.* 2005 Oct;18(10):1385-96.
140. **Sourris KC, Morley AL, Koitka A, Samuel P, Coughlan MT, Penfold SA, Thomas MC, Bierhaus A, Nawroth PP, Yamamoto H, Allen TJ, Walther T, Hussain T, Cooper ME, Forbes JM.** Receptor for AGEs (RAGE) blockade may exert its renoprotective effects in patients with diabetic nephropathy via induction of the angiotensin II type 2 (AT2) receptor. *Diabetologia.* 2010 Nov;53(11):2442-51.
141. **Leonardis D, Basta G, Mallamaci F, Cutrupi S, Pizzini P, Tripepi R, Tripepi G, De Caterina R, Zoccali C.** Circulating soluble receptor for advanced glycation end product (sRAGE) and left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease (CKD). *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012 Sep;22(9):748-55.

142. **Fukami K, Yamagishi S, Okuda S.** Role of AGEs-RAGE system in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des.* 2014;20(14):2395-402.
143. **Mikova B, Jarolimkova E, Benakova H, Dohnal L, Tesar V, Zima T, Kalousova M.** Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) and soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE)--intra- and inter-individual variability in chronic hemodialysis patients. *Scand J Clin Lab Invest.* 2012 Jul;72(4):296-303.
144. **Germanova A, Koucky M, Hajek Z, Parizek A, Zima T, Kalousova M.** Soluble receptor for advanced glycation end products in physiological and pathological pregnancy. *Clin Biochem.* 2010 Mar;43(4-5):442-6.
145. **Mori Y, Kosaki A, Kishimoto N, Kimura T, Iida K, Fukui M, Nakajima F, Nagahara M, Urakami M, Iwasaka T, Matsubara H.** Increased plasma S100A12 (EN-RAGE) levels in hemodialysis patients with atherosclerosis. *Am J Nephrol.* 2009;29(1):18-24.
146. **Hara M, Ando M, Morito T, Nokiba H, Iwasa Y, Tsuchiya K, Nitta K.** S100A12 gene expression is increased in peripheral leukocytes in chronic kidney disease stage 4-5 patients with cardiovascular disease. *Nephron Clin Pract.* 2013;123(3-4):202-8.
147. **Zakiyanov O, Kalousova M, Kriha V, Zima T, Tesar V.** Serum S100A12 (EN-RAGE) levels in patients with decreased renal function and subclinical chronic inflammatory disease. *Kidney Blood Press Res* 2011;34, 457-464.
148. **Kalousova M, Kubena A, Benakova H, Dusilova-Sulkova S, Tesar V, Zima T.** EN-RAGE (extracellular newly identified receptor for advanced glycation end-products binding protein) and mortality of long-term hemodialysis patients: A prospective observational cohort study. *Clinical Biochemistry* 45 (2012) 556-560.
149. **Fukasawa H, Ishigaki S, Kinoshita-Katahashi N, Yasuda H, Kumagai H, Furuya R.** Plasma levels of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) are associated with muscle and fat mass in hemodialysis patients: a cross-sectional study. *Nutr J.* 2014 May 27;13(1):48.
150. **Opatrna S, Popperlova A, Kalousova M, Zima T.** Low Glucose Degradation Product Peritoneal Dialysis Regimen Is Associated With Lower Plasma EN-RAGE and HMGB-1 Proinflammatory Ligands of Receptor for Advanced Glycation End Products. *Ther Apher Dial.* 2014 Jun;18(3):309-16.
151. **Gebhart C, Riehl A, Durchdewald M, Nemeth J, Furstenberger G, Muller-Decker K, et al.** RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development. *J Exp Med* 2008;205:275-85.
152. **Rani SG, Sepuru KM, Yu C.** Interaction of S100A13 with C2 domain of Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE). *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jun 27. pii: S1570-9639(14).
153. **Pettersson-Fernholm K, Forsblom C, Hudson BI, Perola M, Grant PJ, Groop PH.** Finn-Diane Study Group: The functional -374 T/A RAGE gene polymorphism is associated

with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients. *Diabetes*. 2003 Mar;52(3):891-4.

154. **Kankova K, Stejskalova A, Hertlova M, Znojil V.** Haplotype analysis of the RAGE gene: identification of a haplotype marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Jun;20(6):1093-102.

155. **Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, Inoko H, Ikemura T.** Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics* 1994;23:408-.

156. **Hofmann MA, Drury S, Hudson BI, Gleason MR, Qu W, Lu Y, Lalla E, Chitnis S, Monteiro J, Stickland MH, Bucciarelli LG, Moser B, Moxley G, Itescu S, Grant PJ, Gregersen PK, Stern DM, Schmidt AM.** RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response. *Genes Immun*. 2002 May;3(3):123-35.

157. **Falcone C, Campo I, Emanuele E, Buzzi MP, Zorzetto M, Sbarsi I, Cuccia M.** Relationship between the -374T/A RAGE gene polymorphism and angiographic coronary artery disease. *Int J Mol Med*. 2004 Dec;14(6):1061-4.

158. **Thornalley PJ.** The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J*. 1990 Jul 1;269(1):1-11.

159. **Basta G, Leonardis D, Mallamaci F , et al.** Circulating soluble receptor of advanced glycation end product inversely correlates with atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2010; 77 (3) 225-231.

160. **Kalousova M, Germanova A, Jachymova M, Mestek O, Tesar V, Zima T.** A419C (E111A) polymorphism of the glyoxalase I gene and vascular complications in chronic hemodialysis patients. *Ann Ny Acad Sci* 2008;1126:268-271.

161. **Kalousova M, Jachymová M, Germanova A, Kubena AA, Tesar V, Zima T.** Genetic predisposition to advanced glycation end products toxicity is related to prognosis of chronic hemodialysis patients. *Kidney Blood Press Res*. 2010;33(1):30-6.

162. **Baragetti I, Norata GD, Sarcina C, Baragetti A, Rastelli F, Buzzi L, Grigore L, Garlaschelli K, Pozzi C, Catapano AL.** -374 T/A RAGE polymorphism is associated with chronic kidney disease progression in subjects affected by nephrocardiovascular disease. *PLoS One*, 2013 Apr 4;8(4).

163. **Rangel-López A, Paniagua-Medina ME, Urbán-Reyes M, Cortes-Arredondo M, Alvarez-Aguilar C, López-Meza J, Ochoa-Zarzosa A, Lindholm B, García-López E, Paniagua JR.** Genetic damage in patients with chronic kidney disease, peritoneal dialysis and haemodialysis: a comparative study. *Mutagenesis*. 2013 Mar;28(2):219-25.

164. **Kalousova M, Brabcova I, Germanova A, Jachymova M, Matl I, Mestek O, Bandur**

- S, Zima T, Viklicky O.** RAGE polymorphisms, renal function and histological finding at 12 months after renal transplantation. *Clin Biochem.* 2009 Mar;42(4-5):347-52.
165. **Martens HA, Nienhuis HL, Gross S, van der Steege G, Brouwer E, Berden JH, de Sévaux RG, Derksen RH, Voskuyl AE, Berger SP, Navis GJ, Nolte IM, Kallenberg CG, Bijl M.** Receptor for advanced glycation end products (RAGE) polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus and disease severity in lupus nephritis. *Lupus.* 2012 Aug;21(9):959-68.
166. **Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M.** Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003;83:253-307.
167. **Mundel P, Kriz W.** Cell culture of podocytes *Exp Nephrol* 1996;4:263-266.
168. **Perry J, Tam S, Zheng K, Sado Y, Dobson H, Jefferson B, Jacobs R, Thorner PS.** Type IV collagen induces podocytic features in bone marrow stromal stem cells in vitro. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:66-76.
169. **Cybulsky AV, McTavish AJ, Cyr MD.** Extracellular matrix modulates epidermal growth factor receptor activation in rat glomerular epithelial cells. *J Clin Invest* 1994, 94:68-78.
170. **MacKay K, Striker LJ, Elliot S, Pinkert CA, Brinster RL, Striker GE.** Glomerular epithelial, mesangial and endothelial cell lines from transgenic mice. *Kidney Int* 1988;33:677-684.
171. **Delarue F, Virone A, Hagege J, Lacave R, Peraldi MN, Adida C, Rondelu E, Feunteun J, Sraer JD.** Stable cell line of T-SV40 immortalized human glomerular visceral epithelial cells. *Kidney Int* 1991;40:906-912.
172. **Hara M, Yanagihara T, Kihara I.** Urinary podocytes in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron* 2001;89:342-34.
173. **Stefanie U. Vogelmann, W. James Nelson, Bryan D. Mayers, Kevin V. Lemley.** Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Jul;285(1):F40-8.
174. **Petermann AT, Krofft R, Blonski M, Hiromura K, Vaughn M, Pichler R, Griffin S, Wada T, Pippin J, Durvasula R, Shankland SJ.** Podocyte that detach in experimental membranous nephropathy are viable. *Kidney Int* 2003;64:1222-1231.
175. **Doyonnas R, Kershaw DB, Duhme C, et al.** Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin. *J Exp Med.* 2001 Jul 2;194(1):13-27.
176. **Hara M, Yanagihara T, Kihara I.** Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes in IgA nephropathy: Proposal of hypothesis about podocyte injury. *Nephrology (Carlton):* 2004 Dec, 9 Suppl 2:A51.
177. **Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Sekizuka K, Ebihara I, Koide H.** Urinary podocytes for the assessment of disease activity in lupus nephritis. *Am J*

Med Sci.2000 Aug, 320(2): 112-6.

178. **Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, Koide H.** The urinary podocyte as a marker for the differential diagnosis of idiopathic focal glomerulosclerosis and minimal change nephritic syndrome. *Am J Nephrol* 2000, 20: 175-179.

179. **Isao Ebihara, Tsukasa Nakamura, Chifuyu Ushiyama, Shingo Suzuki, Noriali Shimada, Masanori Hara, Hikaru Koide.** Urinary podocytes in patients with chronic renal failure. *Nephron* 2000, 85: 187.

180. **Mundel P, Shankland SJ.** Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Dec;13(12):3005-15.

181. **Habara Peter, Marečková Helena, Tesař Vladimír.** Úloha podocytů v patogeneze glomerulopatií a jejich využití v diagnostice. *Aktuality v nefrologii* 2008, 14:93-99.

182. **Habara P, Marecková H, Sopkova Z, Malickova K, Zivorova D, Zima T, Tesar V.** A novel method for the estimation of podocyte injury: Podocalyxin-positive elements in urine. *Folia Biologica* 54, 162-167(2008).

183. **Yu D, Petermann AT, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, Floege J.** Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1733-1741.

7. Přehled publikací

7.1. Publikace, které jsou podkladem dizertační práce

a) s IF

- Kalousova M., Hodkova M., **Kazderova M.**, Fialova J., Tesar V., Dusilova-Sulkova S., Zima T. Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. Am J Kidney Dis. 2006 Mar;47(3):406-11. **(IF 5,570)**
- Krtil J, Platenik J, **Kazderova M**, Tesar V, Zima T.: Culture methods of glomerular podocytes. Kidney Blood Press Res. 2007;30(3):162-74. Review. **(IF 1,092)**
- **Kratochvilova M**, Zakiyanov O, Kalousova M. Kriha V, Zima T, Tesar V. Associations of serum levels of advanced glycation end products with nutrition markers and anemia in patients with chronic kidney disease. Ren Fail. 2011;33(2):131-7. **(IF 0,824)**

b) bez IF

- **M. Kazderová**, M. Kalousová, V. Tesař, T. Zima: Advanced glycation end products (AGEs) and advanced oxidation protein products (AOPP) in patients with various types of nephropathies. Cardioneurology 9, eds. Timio, M, Witzemann, V., Venanzi, S. Editoriale Bios, Cosenza 2005; 25-28.
- M. Kalousová, M. Hodková, **M. Kazderová**, L. Fialová, V. Tesař, S. Dusilová-Sulková, T. Zima: Levels of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) are related to renal function. Nephrology Dialysis Transplantation 20, 2005, suppl. 5, v130-v131.

7.2. Publikace bez vztahu k tématu disertační práce

a) s IF

- Tesar V, **Kazderova M**, Hlavackova L.: Rokitansky and his first description of polyarteritis nodosa. J Nephrol. 2004 Jan-Feb;17(1):172-4. **(IF 1,338)**
- Kalousova M., Soukupova J., Mestek O., Hodkova M., **Kazderova M.**, Benáková H., Bezdíčková D., Fialová J., Dusilová-Sulková S., Tesař V., Zima T.:Matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and cardiovascular status of hemodialysis patients.J.Am.Soc.Nephrol., Congress 8.-13.11.2005 Philadelphia, Book of Abstracts: 858A. **(IF 7,240)**
- Vojtova L, Zima T, Tesar V, **Kazderova M.**: Study of urinary proteomes in patients with nephrotic syndrome. Folia Biol (Praha). 2007;53(2):58-65. **(IF 0,596)**
- Marta Kalousova, Marie Jachymova, Oto Mestek, Magdalena Hodkova, **Marketa Kazderova**, Vladimir Tesar, Tomas Zima. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) - soluble form (sRAGE) and gene polymorphisms in chronic hemodialysis patients.Nephrol Dial Transplant. 2007 Jul;22(7):2020-6. **(IF 3,167)**
- **Kazderova M**, Jancova E, Rysava R, Merta M, Tesar V. Mycophenolate mofetil in low doses stabilizes and improves antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis and lupus nephritis. Arch Med Res. 2008 Jan;39(1):115-9. **(IF 1,772)**
- Peiskerova M., **Kratochvilova M.**, Kalousova M., Tesar V., Zima T. et al. FGF-23 in chronic kidney diseases. Kidney Blood Press Res. 2009;32(4):276-83. **(IF 1,714)**
- Oskar Zakiyanov, Marta Kalousova, **Marketa Kratochvilova**, Vitezslav Kriha, Tomas Zima, and Vladimir Tesar. Determinants of Circulating Matrix Metalloproteinase-2 and Pregnancy-Associated Plasma Protein-A in Patients with Chronic Kidney Disease. Clin.Lab.2012;58:471-480. **(IF 0,904)**

- Zakiyanov O, Kalousova M, **Kratochvilova M**, Kriha V, Zima T, Tesar V. Changes in levels of matrix metalloproteinase-2 and -9, pregnancy-associated plasma protein-A in patients with various nephropathies. J Nephrol. 2013 May-Jun;26(3):502-9.

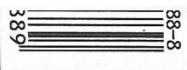
(IF 2,015)

b) bez IF

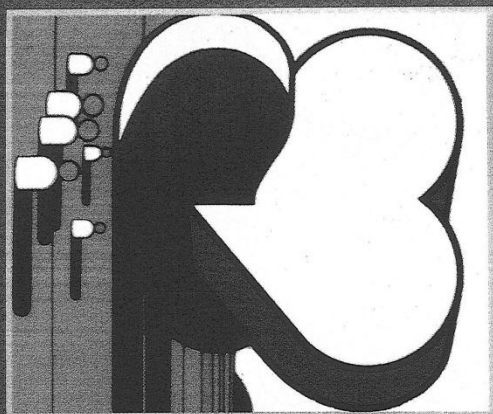
- Marta Kalousová, Magdaléna Hořejší , **Markéta Kazderová** , Jiřina Soukupová , Lenka Fialová, Sylvie Sulková , Vladimír Tesař and Tomáš Zima: Matrix metalloproteinases (MMP-2 and 9) in hemodialysis patients In: Cardioneurology 9, eds. Timio, M, Wizemann, V., Venanzi, S. Editoriale Bios, Cosenza 2005; 91-94.
- Kalousová M., Hodková M., **Kazderová M.**, Tesař V., Dusilová-Sulková S., Zima T.: sRAGE-solubilní receptor pro produkty pokročilé glykace (AGEs) u pacientů s onemocněním ledvin. Vnitřní lékařství 51, 2005, 5:613.
- **Kazderová M.**, Ryšavá R., Jančová E., Merta M., Tesař V.: Treatment with mycophenolate mofetil in vasculitis and lupus nephritis – one centre experience. Nephrol. Dial. Transpl.21, 2006, suppl.4, iv 75
- Habara Peter, Marečková Helena, Malíčková Karin, **Kazderová Markéta**, Tesař Vladimír. Podocytes and podocalyxin as the marker of activity variol glomerulopathies. Alergie č. 4, 2007, s. 298-304.

8. Příložené publikace

1. **M. Kazderová**, M. Kalousová, V. Tesař, T. Zima: Advanced glycation end products (AGEs) and advanced oxidation protein products (AOPP) in patients with various types of nephropathies. *Cardioneurology* 9, eds. Timio, M, Witzemann, V., Venanzi, S. Editoriale Bios, Cosenza 2005; 25-28.
2. Kalousova M., Hodkova M., **Kazderova M.**, Fialova J., Tesar V., Dusilova-Sulkova S., Zima T. Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *Am J Kidney Dis.* 2006 Mar;47(3):406-11. **(IF 5,570)**
3. Krtil J, Platenik J, **Kazderova M**, Tesar V, Zima T.: Culture methods of glomerular podocytes. *Kidney Blood Press Res.* 2007;30(3):162-74. Review. **(IF 1,092)**
4. **Kratochvilova M**, Zakiyanov O, Kalousova M. Kriha V, Zima T, Tesar V. Associations of serum levels of advanced glycation end products with nutrition markers and anemia in patients with chronic kidney disease. *Ren Fail.* 2011;33(2):131-7. **(IF 0,824)**



CARDIONEPHROLOGY₉



M. TIMIO
V. WIZEMANN
S. VENANZI

CARDIONEPHROLOGY₉

editors
MARIO TIMIO
VOLKER WIZEMANN
SANDRO VENANZI

Advanced glycation end products (AGEs) and advanced oxidation protein products (AOPP) in patients with various types of nephropathies

*M. Kazdřiová, ***M. Kalousová, *V. Tesář, ***T. Zima

Department of Nephrology, **Institute of Medical Biochemistry, *Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics First Faculty of Medicine and General University Hospital, Charles University, Prague, Czech Republic*

INTRODUCTION

Oxidative and carbonyl stress lead to formation of glycoxidation products, including advanced glycation end products (AGEs) and advanced oxidation protein products (AOPP). Accumulation of these agents results in modification of proteins [1]. Chronic renal failure is associated with increased oxidative and carbonyl stress that contribute to long-term uremic complications, especially atherosclerotic vascular ones. There are limited data on oxidative stress in different nephropathies and normal renal functions or mild renal insufficiency.

AGEs apart from elevation in the patients with renal failure (in hemodialysed patients and patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis) are increased in diabetics with normal renal function [2, 3] and take part in the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

Plasma concentrations of AOPP as well as AGEs increase with the progression of chronic renal failure in uremic patients with a variety of chronic renal diseases, glomerular and nonglomerular and have the highest levels in patients treated with any method of blood purification [4, 2]. AOPP and AGEs are supposed to have similar biological effect [5].

The aim of our study was to determine advanced glycation end products (AGEs) and advanced oxidation protein products (AOPP) in patients with nephropathy -

lupus nephritis, IgA nephropathy, membranous nephropathy, ANCA positive vasculitis with normal renal functions or slight elevation of serum creatinine.

PATIENTS AND METHODS

Patients

The studied group included 60 patients with 4 types of nephropathies: 18 patients with lupus nephritis (3 men, 15 women, mean age 30 ± 5 years), 17 patients with IgA nephropathy (10 men, 7 women, mean age 34 ± 14 years), 16 patients with membranous nephropathy (8 men, 8 women, mean age 58 ± 15 years) and 9 patients with ANCA positive vasculitis (4 men, 5 women, mean age 49 ± 14 years). All patients had serum creatinine level less than $200 \mu\text{mol/l}$.

The control group consisted of 15 healthy subjects (6 men and 9 women, mean age 44 ± 11 years).

All subjects were examined during stable clinical status (without signs of infection), were not taking any antioxidants and gave their informed consent prior to entering this study.

Blood samples

Blood samples from patients with nephropathies and healthy subjects were collected via venepuncture.

Blood was centrifuged at 3000 rpm , 4°C for 10 minutes and serum was stored at -

AGEs assay

Determination of fluorescent AGEs is based on spectrofluorimetric detection according to Henle [7] and Munch [8]. Blood serum was diluted 1:50 with PBS (phosphate-buffered saline), pH 7.4 and fluorescence intensity was recorded at the emission maximum (~440nm) upon excitation at 350 nm (Fluoromax-3 spectrofluorimeter, Jobin Yvon Horiba, USA). Fluorescence intensity was expressed in arbitrary units as AU.

AOPP assay

AOPP determination was based on spectrophotometric detection according to Witko-Sarsat [4]. For calibration, we applied 200µl of serum diluted 1:5 with PBS, pH 7.4. 200 µl of chloramine T (0-100µmol/l) and 200 µl of PBS as blank to a microtitre plate. Then was added 10µl of 1.16mol/l potassium iodide and 20µl of acetic acid was added and absorbance at 340nm was measured immediately (Multiskan Ascent photometer, LabSystems, Finland). Concentrations of AOPP, determined in reference to the calibration, were expressed in µmol/l.

Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). ANOVA (analysis of variance) was used for evaluation of differences among groups. Correlation coefficient r was used for description of association between parameters. Results were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Serum levels of AGEs and AOPP in patients with nephropathy - lupus nephritis, IgA nephropathy, membranous nephropathy, ANCA positive vasculitis and creatinine level less than 200µmol/l did not significantly differ from healthy subjects (Table 1). We found no significant differences in AGEs and AOPP levels among each type of nephropathies with normal or slight elevation of creatinine level (Table 1). Additionally we found significant correlation of serum creatinine levels and AGEs in patients with lupus nephritis ($r = 0.4863$, $p < 0.04$) and in patients with IgA nephropathy ($r = 0.7042$, $p < 0.0023$) (Fig. 1, 2).

DISCUSSION

Pathogenesis of many diseases and their complications is linked to oxidative

Type of nephropathy/parameter	AGEs (AU)	AOPP (µmol/l)
Lupus nephritis (N=18)	3.08 $\pm$ 0.72 $\times$ 10 ⁵	90.31 $\pm$ 48.76
IgA nephropathy (N=17)	2.99 $\pm$ 0.67 $\times$ 10 ⁵	65.7 $\pm$ 17.2
Membranous Nephropathy (N=16)	3.01 $\pm$ 1.01 $\times$ 10 ⁵	87.7 $\pm$ 33.8
ANCA + vasculitis (N=9)	3.18 $\pm$ 0.90 $\times$ 10 ⁵	79.2 $\pm$ 30.1
Healthy controls (N=15)	2.95 $\pm$ 0.17 $\times$ 10 ⁵	70.35 $\pm$ 10.9

Table 1 - Concentrations of AGEs and AOPP in patients with serum creatinine <200 µmol/l and healthy controls
Results are expressed as mean $\pm$ SD (standard deviation)

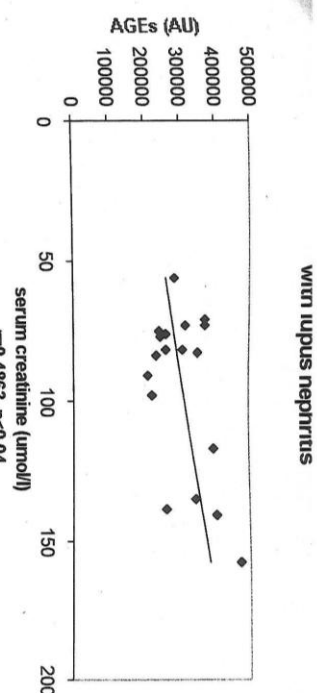


Fig. 1

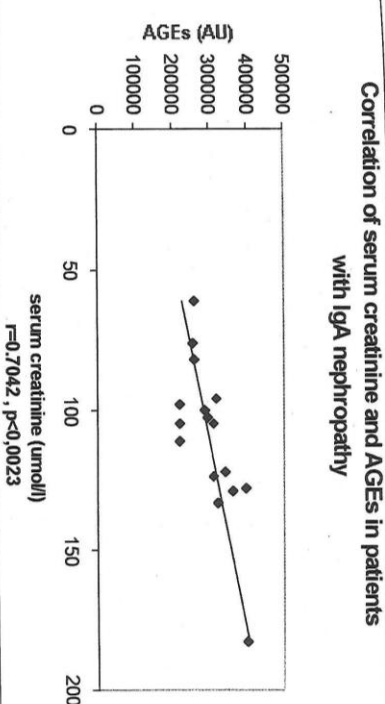


Fig. 2

stress. The most often mentioned ones are diabetes mellitus and its complications, chronic renal failure, uremic and dialysis associated complications. Oxidative stress is enhanced in hyperglycemia and uremia and contributes to increased AGE formation [1,2]. AGEs take part in the pathogenesis of severe and frequent diseases and their complication. AOPP represents a proinflammatory mediator in uremia [9] and is closely correlated with markers of monocyte activation [5]. Plasma levels of AOPP are significantly elevated in uremic patients compared with healthy individuals. The increase of AOPP starts at an early stage of chronic renal failure and gradually rises with the progression of chronic renal failure, there is highly significant inverse relationship between plasma concentrations of AOPP and the glomerular rate [5].

We tried to find out if the type of nephropathy in patients with normal or slight elevation of serum creatinine has any influence on AGEs and AOPP levels. In our study we did not find any significant increase of AGEs and AOPP in patients with nephropathy and normal or slight elevation of serum creatinine. There were no significant differences in levels of AGEs and AOPP between various types of

nephropathies even if they have diverse pathogenesis. In our study, there was no significant correlation of serum creatinine level and AOPP in patients with normal or slight elevation of creatinine and nephropathy. It seems that the significant increase of AOPP can be observed in patients with more advanced renal insufficiency or chronic renal failure. On the other hand, we found significant correlation of serum creatinine level and AGEs in patients with IgA nephropathy and lupus nephritis and normal or slight elevation of creatinine.

We can conclude that the level of both AGEs and AOPP depends more on the renal function than on the type of nephropathy. It is likely that there are more influences on the increase of AGEs and AOPP even if chronic renal failure seems to be the most important.

Aknovalgement: The study was supported by grant IGA MH CZ NR/8094-3.

REFERENCES

- 1) Miyata T, Ypersele de Strihou C, Kurokawa K, Baynes JW: Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: Origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int* 1999; 55: 389 - 399.
- 2) Vlassara H: Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes* 1997; 46:S19-S25.

- 3) Kalousova M, Skřeha J, Zima T: Advanced glycation end products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002; 51: 597-604.
- 4) Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capelliere-Blandin C et al: Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49:1304-1313.
- 5) Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen-Khoa T, Capelliere-Blandin C, Nguyen AH, Canteloup S, Drayer JM, Jungers P, Druke T, Descamps-Latscha B: Advanced oxidation protein products as novel mediator of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161:2524-2532.
- 6) Kalousova M, Sulikova S, Fialova L, Soukupova J, Malbohan I M, Spacek P, Braun M, Mikulikova L, Fortova M, Horejsi M, Tesar V and Zima T: Glycooxidation and inflammation in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 2577-2581.
- 7) Henle T, Depisch R, Beck W, Hergesell O, Hansch G, Ritz E: Advanced glycation end-products (AGE) during haemodialysis treatment: discrepant results with different methodologies reflecting the heterogeneity of AGE compounds. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1968-1975.
- 8) Munch G, Kies R, Wessel A et al: Determination of advanced glycation and products on serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:669-677.
- 9) Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V: Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int* 2001; 59: S108-S113.

Kalousová M., Hodková M., Kazderová M., Fialová J., Tesar V., Dusilová-Sulková S., Zima T.
Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function.

Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products in Patients With Decreased Renal Function

Marta Kalousová, MD, PhD, Magdaléna Hodková, MD, Markéta Kazderová, MD,
Jana Fialová, MD, Vladimír Tesař, MD, DSc,
Sylvie Dusilová-Sulková, MD, DSc, and Tomáš Zima, MD, DSc

• **Background:** Advanced glycation end products (AGEs) accumulate in patients with decreased renal function and exert various toxic effects through the receptor for AGEs (RAGE). Soluble RAGE (sRAGE) is a naturally occurring inhibitor of AGE-RAGE action. The aim of the study is to describe the relationship of sRAGE to renal function and dialysis modalities. **Methods:** The studied group consisted of 81 patients: 25 patients with various degrees of decreased renal function, 20 long-term hemodialysis (HD) patients, 15 peritoneal dialysis (PD) patients, and 21 healthy age-matched subjects. sRAGE was assessed immunochemically (enzyme-linked immunosorbent assay), and routine biochemical parameters were measured by means of certified methods. **Results:** sRAGE level correlates positively with serum creatinine concentration ($r = 0.50$; $P < 0.05$), and its relationship to creatinine clearance is hyperbolic. sRAGE levels are elevated significantly, mainly in patients with end-stage renal disease ($3,119.0 \pm 968.4$ pg/mL in HD patients and $3,652.7 \pm 1,677.7$ pg/mL in PD patients versus $1,405.1 \pm 426.1$ pg/mL in controls; both $P < 0.001$ versus controls). In PD patients, sRAGE is detectable in spent dialysate (median, 75.8 pg/mL), correlates with its serum levels ($r = 0.67$; $P < 0.05$), and is related to protein losses in dialysate. In HD patients, sRAGE levels increase by 50% ($P < 0.001$) from 0 to 15 minutes during both HD and hemodiafiltration, and then decrease until the end of the session. **Conclusion:** Serum sRAGE levels increase in patients with decreased renal function, mainly patients with end-stage renal disease. It remains to be elucidated whether the increase is caused just by decreased renal function or whether sRAGE is upregulated to protect against toxic effects of AGEs. *Am J Kidney Dis* 47:406-411.

© 2006 by the National Kidney Foundation, Inc.

INDEX WORDS: Advanced glycation end products; end-stage renal disease (ESRD); hemodialysis (HD); nephropathy; peritoneal dialysis (PD); receptor for advanced glycation end products; soluble receptor for advanced glycation end products.

THE RECEPTOR (RAGE) for advanced glycation end products (AGEs) is implicated in the pathogenesis of many diseases and pathological states, eg, vascular disease, diabetic complications, or inflammatory diseases.¹⁻⁴ This receptor was characterized first as receptor for AGEs;

however, it is a multiligand receptor that also can bind proinflammatory S100 proteins/calgranulins, amphotericin, or amyloid β -peptide.⁵⁻⁷ AGEs and other ligands exert various toxic effects through RAGE; among them, generation of oxidative stress and upregulation of inflammatory and prothrombotic pathways, followed by tissue injury,^{3,5,6} should be mentioned. AGEs belong to uremic toxins⁸ and take part in the pathogenesis of diabetic and uremic complications.

RAGE exists in several variants, ie, as transmembrane receptor on the cellular surface or isoforms lacking the N-terminal domain (N-truncated variant) or C-terminal (transmembrane) domain (C-truncated variant). This C-truncated RAGE, a 50-kDa protein, produced especially by endothelial cells by means of regulated alternative splicing⁹ or carboxyterminal truncation through metalloproteinases,¹⁰ also known as soluble RAGE (sRAGE) or endogenous secretory RAGE, is a naturally occurring inhibitor of AGE-RAGE action.¹¹ A beneficial effect of RAGE blockade with sRAGE was shown in several animal experiments, eg, it stabilized established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice¹² or

From the Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Department of Nephrology and Department of Medicine Strahov, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Charles University, Prague, Czech Republic.

Received September 15, 2005; accepted in revised form December 8, 2005.

Originally published online as doi:10.1053/j.ajkd.2005.12.028 on January 30, 2006.

Support: Supported by grant from the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health NR/8094-3. Potential conflicts of interest: None.

Address reprint requests to Marta Kalousová, MD, PhD, Associate Professor, Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics, 1st Faculty of Medicine and General University Hospital, Charles University, Karlovo nám 32, 121 11 Prague 2, Czech Republic. E-mail: marta.kalousova@seznam.cz

© 2006 by the National Kidney Foundation, Inc.

0272-6386/06/4703-0005\$32.00/0

doi:10.1053/j.ajkd.2005.12.028

restored effective wound healing in diabetic mice.¹³

AGEs accumulate in patients with decreased renal function,^{14,15} and monocyte expression of RAGE is enhanced in these patients.¹⁶ Protective sRAGE levels are decreased in patients with coronary artery disease in a general population,¹⁷ as well as in patients with hypertension¹⁸ or diabetes mellitus with complications.^{4,19} Patients with decreased renal function are at high cardiovascular risk and often have hypertension or diabetes, factors that decrease sRAGE levels. Conversely, it is probable that circulating RAGE level is influenced by renal function. Because data about sRAGE in patients with decreased kidney function are limited, the aim of our study is to describe the relationship of sRAGE to renal function and dialysis modalities.

METHODS

Patients and Controls

sRAGE was studied in patients with chronic kidney diseases and various degrees of decreased renal function: patients with end-stage renal disease, hemodialysis (HD) and peritoneal dialysis (PD) patients, and healthy controls. Detailed characteristics of patients are listed in Table 1. All

patients were in stable clinical status at the time of the study, without signs of acute infection or acute cardiac problems.

Patients with chronic kidney diseases. The group of patients with chronic kidney diseases (chronic-kidney-disease group) not yet dialyzed consisted of 25 patients. Causes of nephropathy were immunoglobulin A nephritis in 8 patients, antineutrophil cytoplasmic antibody-positive vasculitis in 5 patients, hypertensive nephropathy in 2 patients, diabetic nephropathy in 2 patients, hypertensive nephropathy and diabetic nephropathy together in 2 patients, hypertensive nephropathy and interstitial nephritis in 2 patients, membranous nephropathy in 3 patients, and cystic kidney disease in 1 patient. For their renal diseases, 3 patients were treated with steroids; 4 patients, with steroids plus cyclophosphamide; and 2 patients, with steroids plus chlorambucil.

Patients with end-stage renal disease treated with HD or hemodiafiltration. This group (HD group) consisted of 20 long-term HD patients. Causes of renal failure were as follows: glomerulonephritis in 5 patients, interstitial nephritis in 9 patients, polycystic kidney disease in 4 patients, diabetic nephropathy in 1 patient, and hypertensive nephropathy in 1 patient. The majority of patients were dialyzed 3 times/wk for 4 hours, and their dialysis treatment lasted for 1 to 17 years. In the last 5 months (range, 2 to 19 months), half these patients were treated with hemodiafiltration (HDF). They were administered an average weekly erythropoietin dose of 60 IU/kg body weight. The majority of patients had hypertension and were treated with moderate doses of antihypertensive drugs (angiotensin-converting enzyme inhibi-

Table 1. Characteristics of Study Subjects

	Chronic Kidney Disease	Long-Term HD	PD	Controls
No. of patients (men/women)	25 (12/13)	20 (9/11)	15 (7/8)	21 (9/12)
Age (y)	54 ± 12	54 ± 15	54 ± 11	59 ± 7
Duration of renal disease or dialysis	1 mo-12 y	1-17 y (median, 3 y)	0.5-6 y (median, 2 y)	
Basic characteristics	S-creat, 0.7-5.3 mg/dL CrC, 22-137 mL/min/1.73 m ² PU, 0.06-6.3 g/24 h (median, 1.23g/24 h)	Kt/V > 1.2 RD, 500 mL (0-600 mL)	Kt/V 2.5 RD, 1,500 mL (900-1,900 mL)	S-creat < 1.2 mg/dL CrC > 90 mL/min PU < 0.1 g/24 h
Hypertension	19	16	15	0
Ischemic heart disease	3	5	3	0
Diabetes	5	2	3	0
Dyslipidemia	10	3	12	0
Body mass index (kg/m ²)	26.2 ± 3.7	26.3 ± 3.8	23.9 ± 3.8	24.9 ± 2.9
Albumin (g/dL)	3.4 (3.1-3.7)	4.1 (3.9-4.3)	3.7 (3.6-4.0)	4.3 (4.2-4.4)
Hemoglobin (g/dL)	11.1 (10.0-11.6)	11.2 (10.6-11.9)	11.3 (10.3-11.9)	13.7 (13.5-15.0)
Hematocrit (%)	34.0 (30.0-35.0)	33.4 (31.7-35.7)	31.3 (26.8-35.1)	40.8 (40.1-44.5)

NOTE. Data expressed as mean ± SD, median (interquartile range), or range. To convert serum creatinine in mg/dL to μmol/L, multiply by 88.4; creatinine clearance in mL/min/1.73 m² to mL/s/1.73 m², multiply by 0.01667; serum albumin and hemoglobin in g/dL to g/L, multiply by 10.

Abbreviations: CrC, creatinine clearance; PU, proteinuria; RD, residual diuresis per 24 hours; S-creat, serum creatinine.

tors were administered to 6 patients). Two patients had type 2 diabetes treated with peroral antidiabetics or diet.

Each patient was tested both during standard bicarbonate HD with low-flux polysulfone membranes (F6 or F7; Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany) and during on-line HDF with high-flux polysulfone membranes (HF80; Fresenius Medical Care). Patients were administered heparin during dialysis at a dose of $6,100 \pm 1,500$ IU, and mean ultrafiltration rate per session was 1.9 kg. Blood flow was 300 mL/min, and dialysate flow was 500 mL/min. Endotoxin in dialysate was less than the detection limit (limulin amebocyte lysate test, performed once in 3 months).

Patients with end-stage renal disease treated with PD. This group (PD group) consisted of 15 patients. Causes of renal failure were as follows: glomerulonephritis in 1 patient, interstitial nephritis in 2 patients (and in 2 other patients, 1 patient in combination with glomerulonephritis and 1 patient with diabetic nephropathy), polycystic kidney disease in 2 patients, diabetic nephropathy in 2 patients, hypertensive nephropathy in 2 patients, and hypertensive nephropathy plus immunoglobulin A nephropathy, Alport syndrome, amyloidosis, and Grawitz tumor in 1 patient each. Nine patients were treated with continuous ambulatory PD, and 6 patients, with automated PD. Half the patients used standard glucose dialysis solutions. They were administered an average weekly erythropoietin dose of 60 IU/kg body weight. All patients were treated for hypertension (drugs used included angiotensin-converting enzyme inhibitors in all except 1 patient), and 3 patients had type 2 diabetes (2 patients on insulin therapy).

Control group. The control group consisted of 21 healthy subjects (9 men, 12 women) with a mean age of 59 ± 7 years. They were not administered any special alimentary supplements by the time of the study.

The study was approved by the local institutional ethics committee, and all patients gave informed consent before entering the study. The study is registered as a clinical trial in The Cochrane Renal Group Registry (<http://www.cochrane-renal.org/dbsearch.php>), and its identification number is CRG110500018.

Samples

In HD patients, blood was collected through puncture of the arteriovenous fistula and from the arterial tubing at time 0 (start) and 15, 120, and 240 minutes (end) of the dialysis session during both HD and HDF. In other subjects, blood was collected after overnight fasting through puncture of the cubital vein, simultaneously with blood collection for routine control examinations. Blood was centrifuged for 10 minutes at 1,450g, and serum or plasma in samples collected during HD/HDF was frozen at -80°C . Additionally, in patients with renal insufficiency not yet dialyzed, a 24-hour urine sample was collected, and in PD patients, spent dialysate was collected, frozen, and also used for analysis. Analysis of all samples was performed within 6 months after collection.

Laboratory Parameters

sRAGE assay. sRAGE was measured by means of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay by using standard kits (Quantikine; RD Systems, Minneapolis, MN) ac-

cording to the manufacturer's protocol. In this assay, the plate is coated with a monoclonal antibody against RAGE, and a polyclonal antibody is used for detection. Mean minimal detectable dose of RAGE is 4.12 pg/mL. Results are given in picograms per milliliter. In the substudy comparing HD and HDF, results were corrected for albumin content because of hemoconcentration and expressed in nanograms per gram of albumin.

Other parameters. Cancer antigen 125 was measured by means of chemiluminescent immunoanalysis by using an ADVIA Centaur analyzer (Bayer Corporation, Tarrytown, NY).

Routine biochemical parameters were determined by means of standard clinical chemistry methods recommended by the International Federation of Clinical Chemistry by using automated analyzers.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SD and, in the case of high interindividual variability, median and interquartile range. Analysis of variance, Mann-Whitney test, and *t*-test were used for evaluation of differences among groups. Two-factor analysis of variance was used to determine the influence of type of procedure (HD/HDF) and the effect of time, and analysis of variance repeated measures with post tests, as well as unpaired *t*-test, were used for more detailed analysis. Associations between parameters were determined by using Pearson and Spearman correlation coefficients. All results are considered statistically significant at *P* less than 0.05.

RESULTS

In patients with chronic kidney diseases and various degrees of decreased renal function, sRAGE level correlates significantly positively with serum creatinine concentration ($r = 0.50$; $P < 0.05$; Fig 1) and negatively with reciprocal value of

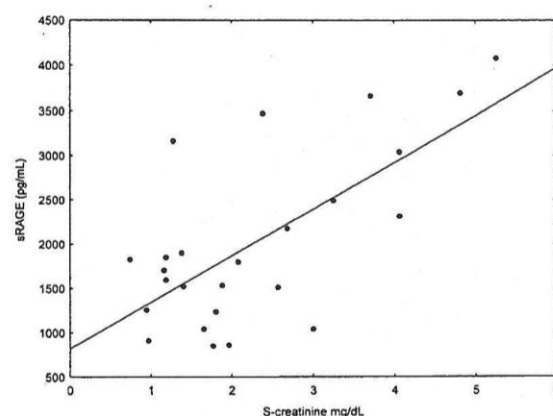


Fig 1. Correlation between sRAGE and serum creatinine levels in patients with chronic kidney diseases ($r = 0.50$; $P < 0.05$; $y = 818.09 + 525.76 \cdot x$). To convert creatinine in mg/dL to $\mu\text{mol/L}$, multiply by 88.4.

estimated glomerular filtration rate ($r = 0.53$; $P < 0.05$) because the relationship to creatinine clearance is hyperbolic (Fig 2). In 5 patients with nephropathy, sRAGE also was detectable in urine samples (25, 64, 1,027, 54, and 102 pg/mL), and 4 of these patients had heavy proteinuria (protein >3.5 g/24 h). In other patients with urinary sRAGE levels less than the detection limit, proteinuria had protein less than 2 g/24 h.

sRAGE levels were elevated significantly, mainly in patients with end-stage renal disease (both HD and PD patients) in comparison to healthy subjects, without significant differences between HD and PD patients ($3,119.0 \pm 968.4$ pg/mL in HD patients and $3,652.7 \pm 1,677.7$ pg/mL in PD patients versus $1,405.1 \pm 426.1$ pg/mL in controls; both $P < 0.001$ versus controls; Fig 3). In HD patients, sRAGE level elevation was not dependent on the use of angiotensin-converting enzyme inhibitors.

In PD patients, sRAGE is detectable in spent dialysate (75.8 pg/mL; interquartile range, 11.6 to 111.6 pg/mL) and correlates with its serum levels ($r = 0.67$; $P < 0.05$). sRAGE level was not related to cancer antigen 125 as a marker of peritoneal damage in either dialysate or serum. sRAGE level in dialysate was associated with protein losses to the dialysate; it correlated significantly with both total protein ($r = 0.72$; $P < 0.05$) and albumin ($r = 0.75$; $P < 0.05$) concentrations in dialysate.

In HD patients, sRAGE levels changed significantly both during HD and HDF without signifi-

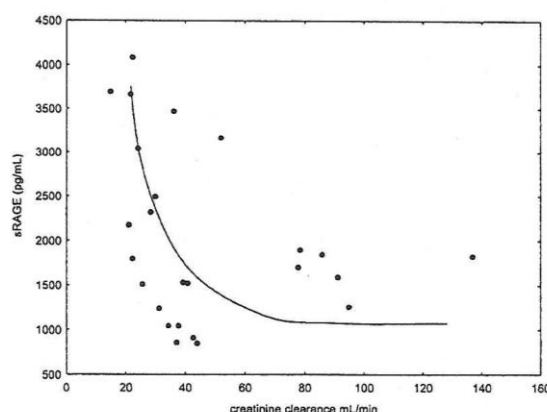


Fig 2. Relationship between sRAGE level and creatinine clearance in patients with chronic kidney diseases. To convert creatinine clearance in mL/min to mL/s, multiply by 0.01667.

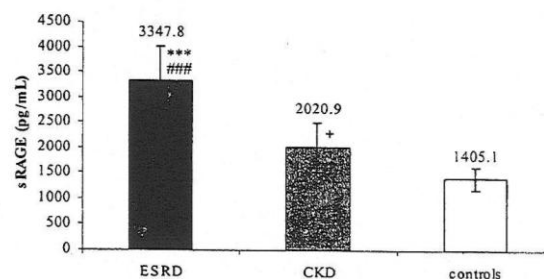


Fig 3. sRAGE levels in patients with chronic kidney disease and various degrees of decreased renal function (CKD), patients with end-stage renal disease (ESRD; HD and PD patients), and healthy subjects. Results expressed as mean $\pm$ SD. *** $P < 0.001$, ESRD versus controls. ### $P < 0.001$, ESRD versus CKD. + $P < 0.05$, CKD versus controls.

cant differences between these 2 procedures. Levels increased significantly from 0 to 15 minutes of the session (50% increase; $P < 0.001$) and then decreased until the end of the session (Table 2).

In summary, sRAGE levels increased in patients with renal impairment, mainly in dialysis patients. It also was present in spent dialysate and levels changed significantly during HD and HDF without significant differences between these 2 procedures.

DISCUSSION

This study shows for the first time that sRAGE levels increase in patients with decreased renal function independently of the cause of kidney disease. However, some influence of the kidney also was supposed in previous studies that focused on other diseases because patients with impaired renal function were not included.^{17,20} sRAGE probably is filtered (at least partially) by renal glomeruli and then processed by renal tubules. In patients with heavy proteinuria, sRAGE subsequently is present in urine. The role of renal tubules in sRAGE metabolism was confirmed by Cheng et al,²¹ who described its presence in renal tubules and renal tubular lumen.

sRAGE levels increased, especially in patients with end-stage renal disease (without differences between HD and PD patients), implicating that decreased renal function is a more important determinant of sRAGE level than dialysis technique. It remains a question whether sRAGE level elevation is only an epiphenomenon accom-

Table 2. sRAGE Levels During HD and HDF

	sRAGE (ng/g albumin)			
	Time 0	Time 15	Time 120	Time 240
HD	80.7 ± 24.3	126.0 ± 25.9*	100.3 ± 29.5*†	96.1 ± 36.8†‡
HDF	86.7 ± 30.8	125.4 ± 24.8*	97.8 ± 32.8†	92.0 ± 37.6†

NOTE. Results expressed as mean ± SD. Time is minutes.

* $P < 0.001$ versus time 0.

† $P < 0.001$ versus time 15.

‡ $P < 0.05$ versus time 0.

panying decreased renal function or sRAGE is upregulated as a protective factor against toxic effects of AGEs and other toxins accumulating in patients with uremia. Previous studies showed decreased sRAGE levels in such pathophysiological situations as essential hypertension,¹⁸ coronary artery disease,¹⁷ and rheumatoid arthritis,²⁰ which implied that decreased sRAGE levels increased the propensity toward inflammation. Because RAGE is involved in amplifying the inflammatory response³ and chronic renal insufficiency per se is associated with inflammation and oxidative stress,^{14,22} in context with previous studies, we could expect decreased instead of increased sRAGE levels. In patients with decreased renal function, other mechanisms probably are of greater significance, such as counterregulation of inflammation. A recent study showed that angiotensin-converting enzyme inhibition increased the production and secretion of sRAGE into plasma and thus decreased AGE accumulation in patients with diabetes.²³ We did not observe such an effect in our study with dialysis patients. However, a larger number of patients should be tested to be able to confirm or exclude the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors in this population.

sRAGE also is detectable in other fluids apart from serum/plasma, eg, synovial fluid.²⁰ We measured it in very low levels in spent dialysate of PD patients and showed its significant correlation with serum levels. These results allow us to speculate about the possible effect of dialysis solution on the peritoneum, although no relationship to cancer antigen 125 level as a marker of peritoneal damage was observed. Similarly, as in patients with chronic kidney diseases and heavy proteinuria, for whom sRAGE was detected in urine, sRAGE in dialysate was associated with

protein losses to the dialysate and thus related to peritoneal characteristics.

During HD and HDF, sRAGE levels increased in the 15th minute of the procedure by more than 50% and then decreased until the end of the session to predialysis levels. Release of sRAGE as a protective factor from cells leading to its enormous elevation could be related to stimulation of neutrophils on the dialysis membrane, their respiratory burst, and thus induction of inflammatory reaction and oxidative stress.²⁴⁻²⁶ Puncture of the arteriovenous fistula might, apart from other mechanisms, lead to the release of this substance into the circulation and contribute to its increase. Additionally, sRAGE was found to bind to heparin,¹⁰ and the maximal increase was observed after the start of the dialysis procedure, ie, after heparin administration. Despite possible degradation and clearance during HD/HDF, its level remains elevated in comparison to healthy subjects and might modulate vascular damage.

Use of sRAGE level as a marker of risk was proposed in patients with several diseases (hypertension,¹⁸ diabetes mellitus,^{4,19} and coronary artery disease¹⁷), and it is speculated whether sRAGE will gain the same importance as C-reactive protein.⁶ However, when measuring sRAGE in serum and/or plasma, we should be aware of the patient's kidney function because it can influence sRAGE levels and modify our results.

In conclusion, in this study, we show for the first time that serum sRAGE levels increase in patients with decreased renal function, mainly patients with end-stage renal disease. It remains to be elucidated whether the increase is caused only by decreased renal function or whether sRAGE is upregulated to protect against toxic effects of AGEs.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dr Soukupová, Dr Benáková, and the nurses and laboratory technicians for their assistance.

REFERENCES

- Schmidt AM, Hori O, Chen JX, et al: Advanced glycation end products interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice: A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 96:1395-1403, 1995
- Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, et al: Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy: Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* 97:238-243, 1996
- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM: The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 108:949-955, 2001
- Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Watanabe T, Yamamoto H: Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. *J Pharmacol Sci* 97:305-311, 2005
- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM: The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta* 1498:99-111, 2000
- Hudson BI, Harja E, Moser B, Schmidt AM: Soluble receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE) and coronary artery disease. The next C-reactive protein? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:879-882, 2005
- Kalousova M, Zima T, Tesar V, Dusilova-Sulkova S, Skrha J: Advanced glycoxidation end products in chronic diseases—Clinical chemistry and genetic background. *Mutat Res* 579:37-46, 2005
- Vanholder R, Argiles A, Baurmeister U, et al: Uremic toxicity: Present state of the art. *Int J Artif Organs* 24:695-725, 2001
- Schlueter C, Hauke S, Flohr AM, Rogalla P, Bullerdiek J: Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms—A result of regulated alternative splicing? *Biochim Biophys Acta* 1630:1-6, 2003
- Hanford LE, Engild JJ, Valnickova Z, et al: Purification and characterization of mouse soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE). *J Biol Chem* 279:50019-50024, 2004
- Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, et al: Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* 370:1097-1109, 2003
- Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, et al: RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 106:2827-2835, 2002
- Goova MT, Li J, Kislinger T, et al: Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol* 159:513-525, 2001
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, et al: Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 161:2524-2532, 1998
- Kalousova M, Sulkova S, Fialova L, et al: Glycoxidation and inflammation in chronic hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 18:2577-2581, 2003
- Hou FF, Ren H, Owen WF Jr, et al: Enhanced expression of receptor for advanced glycation end products in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 15:1889-1896, 2004
- Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, et al: Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in non-diabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1032-1037, 2005
- Geroldi D, Falcone C, Emanuele E, et al: Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end-products in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 23:1725-1729, 2005
- Katakami N, Matsuhisa M, Kaneto H, et al: Decreased endogenous secretory advanced glycation end product receptor in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 28:2716-2721, 2005
- Pullerits R, Bokarewa M, Dahlberg L, Tarkowski A: Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res Ther* 7:R817-R824, 2005
- Cheng C, Tsuneyama K, Kominami R, et al: Expression profiling of endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in human organs. *Mod Pathol* 18:1385-1396, 2005
- Locatelli F, Canaud B, Eckhardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zocalli C: Oxidative stress in end-stage renal disease: An emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 18:1272-1280, 2003
- Forbes JM, Thorpe SR, Thallas-Bonke V, et al: Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibitor in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 16:2363-2372, 2005
- Castaldello K, Husson C, Wens R, Vanherweghem JL, Tielemans C: Role of complement and platelet-activation factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species products during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 15:1638-1646, 2000
- Zima T, Haragsim L, Štípek S, Bártová V, Nemeček K: Lipid peroxidation on dialysis membrane. *Biochem Mol Biol Int* 29:531-537, 1993
- Ward RA, Ouseph R, McLeish KR: Effect of high-flux hemodialysis on oxidant stress. *Kidney Int* 63:353-359, 2003

Culture Methods of Glomerular Podocytes

J. Krtíl^{a, b} J. Pláteník^a M. Kazderová^c V. Tesař^c T. Zima^b

Institutes of ^aMedical Biochemistry and ^bClinical Chemistry and Laboratory Medicine and

^cDepartment of Nephrology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Key Words

Visceral glomerular epithelial cells · Glomerulopathies · Podocyte culture · Phenotypic markers

Abstract

Podocytes (glomerular visceral epithelial cells) cover the exterior surface of the glomerular capillaries and contribute to the glomerular filtration membrane. Failure of podocyte function is involved in the progression of chronic glomerular disease; accordingly, research interest into podocyte biology is driven by the need for better protection and perhaps recovery of these cells in renal diseases. This review aims at summarizing available techniques for podocyte cell cultures from both the past and present, with special attention to the currently used methods. The establishment of classical primary cultures is based on isolation of glomeruli by differential sieving. Plating of glomeruli onto a collagen surface is followed by an outgrowth of cobblestone-like cells that, after replating, differentiate into arborized, mature podocytes. Currently, the majority of research studies use immortalized podocytic cell lines most often derived from transgenic mice bearing a conditional immortalizing gene. The podocytes can also be collected and cultured from healthy or diseased animal or patient urine. The urinary podocytes obtained from subjects with active glomerulopathies display higher proliferation potential and viability in vitro, perhaps due to disease-induced transdifferentiation. Finally, a list of phenotypic markers useful for identification and characterization of the cultured podocytic elements is provided.

Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

Introduction

Podocytes, also called glomerular visceral epithelial cells, are terminally differentiated, highly specialized cells with a unique location, architecture, and relevance. They cover the exterior surface of the basal membranes of the glomerular capillaries with multiple interdigitating foot-like processes [1]. The processes, with filtration slits in between, are the most prominent features of podocytic cells. The slit diaphragm plays a crucial role in establishment of the size- and charge-selective permeability of the glomerular filtration barrier, thus preventing proteinuria. The podocytes are often the prominent targets in many types of renal injury; failure of the podocyte function decisively contributes to the development of glomerulosclerosis, seen in the progression of many renal diseases [2].

Since the mid-90s, when initial groundbreaking reports on the possible involvement of podocytes in the progression of chronic glomerular disease appeared [e.g., 3, 4], these cells have become a favorite subject of research in experimental nephrology. As any other cell type, podocytes can be studied by a variety of in vivo and in vitro approaches. For the latter, cell culture technology is invaluable for studying the (patho)physiological properties of podocytes.

The last review article that was devoted solely to culture methods of podocytes appeared in 1996 [5]. Since that time, a plethora of new information and novel technological advances have been generated in this field. Our review aims at summarizing the techniques available for

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2007 S. Karger AG, Basel
1420–4096/07/0303–0162\$23.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/kbr

Jan Krtíl, MD

Charles University in Prague, First Faculty of Medicine
Institute of Medical Biochemistry, Katerinska 32
CZ-121 08 Praha 2 (Czech Republic)
Tel. +420 2 2496 4275, Fax +420 2 2496 4280, E-Mail juan@email.cz

podocyte cultures from both the past and the present, with special attention paid to the more currently used methods. We discuss first the establishment of primary cultures and then the variety of immortalized podocytic cell lines. We also review the potential to cultivate podocytes from urine as a new and promising method for monitoring the activity of some glomerulopathies, such as idiopathic nephrotic syndrome, membranous nephropathy, lupus nephritis, and diabetic nephropathy [6].

Finally, we provide a list of phenotypic markers useful for proper identification and characterization of the cultured podocytic elements. This comprehensive review will help investigators choose a culture method best suited for a particular research goal and will perhaps also encourage much-needed research on podocyte biology in general.

Primary Cultures of Podocytes

Krakower and Greenspon [7] in 1954 were probably the first who described a method for isolation and primary culture of renal podocytes. However, it was not until the 70s and 80s that modifications of the described practice allowed the technique to become more widely used. The methods for culturing glomerular visceral epithelial cells, as well as other types of glomerular cells, represented a significant scientific advancement, as they allowed a more specific investigation into the role(s) of individual glomerular cell types in both renal physiology and renal pathology. Some of the experimental techniques developed during the 70s are still used today, albeit in modified form.

The majority of experimental procedures used for the preparation of podocytic cultures are based on the original work of Krakower and Greenspon [7], later modified by Burlington and Cronkite [8]. Briefly, under aseptic conditions, decapsulated rat cortical slices are pressed through a series of stainless steel sieves (sieving method) with decreasing pore sizes of 250 and 150 μm ; as a final step, the glomeruli are then collected on a 75- μm sieve. The original procedure described by Krakower and Greenspon [7] used only two screens of 250 and 150 μm . Glomeruli from other species can be harvested using different size combinations of screens [9]. For example, for human glomeruli, Striker et al. [10] used a series of sieves of 190, 140, 120, and 104 μm (retention). With the sieving technique, it has been reported that, for the rat kidney, about 86% of the glomeruli were not encapsulated [11].

After collection, the glomeruli can be plated either directly onto a culture dish for an outgrowth of cells or subjected to enzymatic dissociation. There are several protocols for the digestion of glomeruli. Striker et al. [10] treated human glomeruli with collagenase (750 U/ml) at 37°C for 10–60 min. Harper et al. [12] digested rat glomeruli with 0.2% trypsin for 20 min, followed by an incubation in 0.1% collagenase for 40 min at 37°C. Kreisberg et al. [11] incubated rat glomeruli in Hanks' balanced salt solution containing collagenase (0.1%), trypsin (0.2%), and deoxyribonuclease (0.01%) at 37°C for 20 min. Enzymatic dissociation is currently not the preferred method, however, as it is difficult to prevent overdigestion of glomeruli, which may then impair cell viability and lead to the liberation of mesangial cells, thus resulting in a mixed cell population in vitro. Enzymatic dissociation of the entire glomeruli can be justified in some cases, e.g., if coupled to cloning of the particular cell types; the efficiency of this approach, however, is rather low.

Nonenzymatic Preparation of Glomeruli

Currently, glomeruli needed for the establishment of both primary and conditionally immortalized podocytic cultures are typically harvested without any additional enzymatic treatment, as described originally by Quigg et al. [13] and later modified by Johnson et al. [14]. The isolated glomeruli are first seeded onto commercially available bovine dermal collagen matrix (Vitrogen; Collagen Corp., Palo Alto, Calif., USA) plates and cultured in K1-3T3 media. Colony outgrowths of glomerular epithelial cells are replated onto a collagen type I surface and subsequently maintained in K1 media with NuSerum; alternatively, serum-free medium consisting of either K1 medium or CS-2 medium with supplements (epidermal growth factor, hydrocortisone, and nonessential amino acids) can also be used. The glomerular epithelial cells, putatively the podocytes, appear polygonal in shape under a phase-contrast microscope; they can be passaged several times, as long as they continue to proliferate. When grown on type I collagen, they appear slightly larger than when cultured on an uncoated plastic surface. Using immunofluorescence staining, cultured cells are negative for factor VIII and Thy 1.1, but positive for Fx1A, cytokeratin, and podocalyxin.

The sieving technique is believed to remove the parietal sheet of glomerular cells, thus exposing the visceral glomerular cells (podocytes) and allowing their outgrowth. However, some authors have questioned the homogeneity of the glomerular cell cultures prepared in this classical way. For instance, Weinstein et al. [15] isolated

glomeruli from young 50-gram rats by differential sieving (250, 105, and 62 μm); the glomeruli were then maintained on collagen in a 1:1 mixture of K1 media containing 5% NuSerum and conditioned media from Swiss mouse 3T3 fibroblasts containing 10% fetal bovine serum (FBS). From 5 to 15% of all harvested glomeruli were encapsulated, but independently of the presence of Bowman's capsule, the vast majority of the cell outgrowth displayed polygonal cobblestone morphology and expressed known *in vivo* markers for parietal cells (positive for cytokeratin, negative for vimentin and desmin). However, a few cells appeared larger, were irregularly shaped, and they did not proliferate. If, alternatively, the kidney was perfused with collagenase before the isolation of glomeruli, no cell outgrowth could be obtained [15].

In an attempt to avoid podocyte damage during the sieving process, Yaoita et al. [16] harvested glomeruli using only two screens, with pore sizes of 250 and 75 μm . This method was performed without any mechanical pressure on the glomeruli. Decapsulated and encapsulated glomeruli were manually separated under a microscope and then cultured separately on collagen type I in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 medium supplemented with 5% FBS. The authors observed a higher rate of cell outgrowth from the decapsulated glomeruli (mean 25% of them) as compared with isolation by conventional sieving methods described previously [14]. They also described different types of cells dependent on whether or not they were harvested from decapsulated or encapsulated glomeruli. Decapsulated glomeruli generated large arborized cells with a marker profile typical of podocytes *in vivo* (positive for WT-1, synaptopodin, and podocalyxin). On the other hand, cells from encapsulated glomeruli fell morphologically into two distinct cellular types: polygonal cobblestone-like cells localized in the colony centers and large irregularly shaped cells occupying the colony peripheries. Using immunostaining, the cobblestones stained positive for WT-1, but the stain was weaker than that for the arborized cells; they were also faintly positive for synaptopodin, yet no podocalyxin was detected. The large irregularly shaped cells were very weakly positive for synaptopodin and negative for podocalyxin. It has been suggested then that the cells growing out from the decapsulated glomeruli are podocytes, while the polygonal cells from encapsulated glomeruli are derived from parietal epithelial cells, and part of them (the large irregularly shaped elements) modify their phenotype to resemble podocytes *in vitro*.

In their landmark study, Mundel et al. [17] modified standard culture conditions so that remarkable differen-

tiation of podocytes was achieved in the first subculture and that further passages could be avoided. They observed a conversion of cobblestones (undifferentiated and proliferating podocytes) into arborized cells that more closely resembled podocytes *in vivo*; moreover, some intermediate phenotypes were documented. In the procedure of Mundel et al. [17], primary cellular outgrowth (fig. 1a) is separated from the glomerular cores with 25- μm sieves in the first passage; the cells are then allowed to differentiate on type I collagen. Within 2–3 weeks, the subcultured cobblestones transform into individual arborized cells (fig. 1b). The podocyte origin of both cell types was confirmed by positive staining for WT-1, as well as podocyte-specific O-acetylated ganglioside; furthermore, the arborized cells expressed synaptopodin (formerly pp44), a prominent marker of differentiated podocytes. The process of conversion was independent of most culture condition variables (e.g., type of culture medium, serum contents in medium, type of coating). Only a high plating density delayed the conversion, but failed to prevent it.

The work of Mundel et al. [17] showed for the first time that podocytes can effectively differentiate *in vitro*. In addition, this study has brought to light evidence that podocytic cells can appear in culture in two different forms and that there is a direct conversion of dedifferentiated cobblestone cells through intermediate phenotypes into the arborized cells of a more advanced differentiation state (but not terminally differentiated because of lack of podocalyxin and a '51-kDa slit-membrane-associated protein'). It is with this point that the work by Mundel et al. [17] disagrees with the findings published by Weinstein et al. [15] and Yaoita et al. [16] discussed above. Finally, according to Mundel et al. [17], the conversion to arborized cells is inducible by avoiding subcultivation of the cobblestones. This observation is useful, as it facilitates preparation of mature podocytic cultures for *in vitro* experiments.

Primary Cultures of Human Fetal Podocytes

Primary cultures of human fetal podocytes have also been derived [18]. Using the differential sieving technique (149- and 70- μm sieves), glomeruli were harvested from fetal kidneys at 8–18 weeks of gestation (from therapeutic abortions). In order to obtain glomerular outgrowths, the glomeruli were maintained in Iscove's modified Dulbecco's medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). After the first passage, the cells were cultured in medium with the FCS content decreased to 1% for 14 days, with the aim to promote exit of the cells

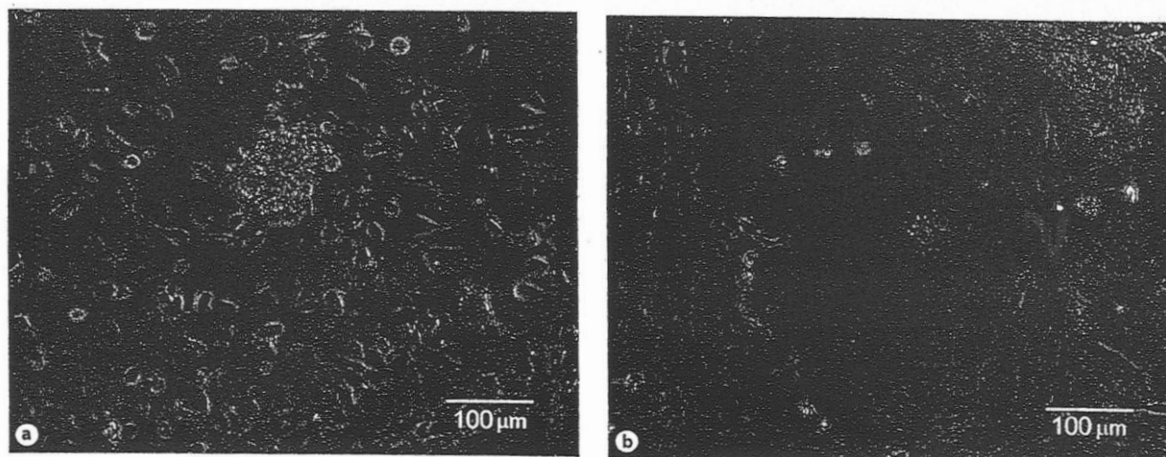


Fig. 1. Primary podocyte cultures prepared according to Mundel et al. [17] in various stages of development in vitro. **a** Cellular outgrowth from a decapsulated glomerulus 5 days in vitro after plating onto collagen type I in RPMI 1640 plus 10% FCS. Mostly undifferentiated cobblestone-like cells are seen. $\times 200$. **b** Fully differentiated arborized podocytes on day 10 of the first subculture under identical culture conditions. $\times 200$.

from the cell cycle and differentiation. After this period, the cellular phenotype was confirmed, and the cells were further subcultured and then used for experiments with the second to the fifth passage. After the sixth passage, some phenotypic changes and limited viability were observed. Although the cells displayed positive phenotypic markers of mature podocytes, such as WT-1, synaptopodin, C3b complement receptor-1, and, in some recent work [19], nephrin, it is in our opinion that their differentiation state should be considered with caution, because the cells were derived from highly immature fetal kidneys and were kept in a proliferating state through several subcultures.

The same isolation methods for glomeruli, used for the establishment of primary podocytic cultures, also serve to prepare glomeruli as a source of immortalized podocytic cell lines, as discussed below.

Immortalized Podocytes

The majority of terminally differentiated cells display only restricted proliferation capability; initially, only tumor cells or spontaneously transformed, immortalized nontumor cells could give rise to continuous cell lines. In order to provide the in vitro cultured cells with an ability to divide indefinitely, immortalized cell lines have been

established from various tissues [e.g., 20–22]. Several methods for the production of continuously (constitutively) immortalized cells have been developed. One of them is based on the insertion of an immortalizing gene encoding the simian virus 40 (SV40) large tumor antigen (TA_g) into in vitro cultured cells by transfection or retroviral infection. Alternatively, the cells for culture are isolated from transgenic mice harboring the SV40 TA_g immortalizing gene.

The main concern with the cells continuously expressing an immortalizing gene is that the cellular physiology is altered due to continuous proliferation [23–25]. Moreover, particular methods have other disadvantages. In order to obtain sufficient amounts of transfected cells, a large number of cells for treatment is required; in the viral-mediated infection, only dividing cells are sensitive to gene incorporation. Also, for this type of an approach, the immortalizing gene is distributed randomly in cell populations. Another concern is that transgenic mice bearing an immortalizing gene appear to suffer from tumors and aberrant development [25]. Therefore, in order to overcome these problems, conditional immortalizing genes are inserted into cultured cells to switch from the proliferation stage to differentiation following inactivation of the immortalizing gene or its product. For example, the SV40 temperature-sensitive mutant strain tsA58 encoding a thermolabile TA_g that is capable to immortalize only

at the permissive temperature has been used in many cell lines [e.g., 26–28]. However, this method did not remove the general difficulties associated with generating cell lines by means of transfection or infection. A more advanced approach has been developed using transgenic mice harboring a 'double' conditional immortalizing gene. The animals were generated by the insertion of a hybrid construct consisting of the mouse major histocompatibility complex *H-2K^b* class I promoter, induced by interferons, and the tsA58 early region encoding TAG [29, 30]. Cells isolated from this transgenic mouse, or 'immortomouse', are allowed to multiply only under a permissive temperature and the simultaneous presence of interferon gamma (IFN- γ), whereas a nonpermissive temperature without any IFN- γ shifts the cells to differentiation.

Exposure to IFN- γ induces activation of the *H-2K^b* promoter, driving expression of the immortalizing protein tsA58 TAG which remains stable and is functional at the permissive temperature (33°C). If IFN- γ is removed and the cells are placed at a nonpermissive temperature (37–39.5°C), the tsA58 TAG protein synthesis stops, the previously expressed tsA58 TAG is rapidly degraded, and the cells shift from proliferation to differentiation [26, 30, 31]. The cells generated by this method are genetically homogeneous, can be harvested in large numbers, and can terminally differentiate [25]. However, they are still not identical to native cells, because they carry an immortalization gene that is abnormally expressed during cell propagation, and the prolonged effects of this abnormal expression on the cell physiology are not known [32].

As primary cultured podocytes derived from rat or human kidney display partial *in vitro* differentiation associated with growth arrest, there has been the specific aim among podocyte researchers to create a podocyte cell line retaining the potential for both proliferation and differentiation. The first long-term cultured immortalized cell line of glomerular epithelial cells – putative podocytes – was established together with lines of mesangial and glomerular endothelial cells from mice transgenic for the early region of SV40 (encoding the TAG) [33]. Major problems were associated with this line, as well as other irreversibly immortalized podocyte cell lines derived later [34, 35], where the cells would proliferate but without any significant tendency to differentiate.

More recently, in their cornerstone work, Mundel et al. [36] described a generation of conditionally immortalized murine podocyte lines. From kidneys of adult (10-week-old) transgenic *H-2K^b*-tsA58 mice created by Jat et al. [25], the glomeruli were isolated by the standard three-step sieving method and grown in RPMI 1640 medium

with 10% FCS. The outgrowths of the cells were separated from the remaining glomerular cores using a sieve with a pore size of 33 μ m; the cells were then further propagated on collagen type I at 33°C in the same medium with the addition of 100 U/ml IFN- γ (generating permissive conditions). To induce differentiation, the cells were shifted to 37°C and maintained in the medium without IFN- γ (nonpermissive conditions). Under the nonpermissive conditions, most of the cells became growth arrested within 6–14 days. The podocyte phenotype was confirmed by positive WT-1 staining in both proliferating and differentiating cells; the differentiated cells were also positive for synaptopodin. The IFN- γ concentration could be gradually reduced to 10 U/ml without noticeable effects on cellular proliferation or morphology. Spontaneous transformation of cells was occasionally observed in cultures exceeding 30 passages. As a standard nonpermissive temperature, Mundel et al. [36] chose 37°C, because culturing at 39°C, originally used by Jat et al. [25], resulted in a higher rate of cell death. Interestingly, the growth arrest was reversible, if the cells were returned back to permissive conditions.

The immortalized podocytes used in recent studies are usually derived from murine or human kidney tissue. Most authors have established murine podocyte lines as described by Mundel et al. [36] in the above-mentioned work, with some small modifications. The murine immortalized podocytes are exclusively derived from transgenic animals (the 'immortomouse') rather than by *ex vivo* transfection or infection. In these studies, both proliferating and differentiating podocytes were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. In order to propagate the cells, a temperature of 33°C and the presence of IFN- γ in the culture medium (permissive conditions) are required. IFN- γ is typically added at a concentration of 10 U/ml, yet Schiffer et al. [37] and Wada et al. [38] used concentrations as high as 20 and 50 U/ml, respectively, without any reference to an effect on cell division. Cell differentiation was then induced by the omission of IFN- γ from the complete medium and by raising the temperature to 37–39°C. The cells were allowed to mature on collagen type I for 7–14 days, most often for at least 10–14 days [e.g., 38–41].

It is unclear whether an IFN- γ concentration >10 U/ml is beneficial, as Mundel et al. [36] showed that there is no increase in cell proliferation at higher concentrations. Further potential controversy exists about what should be recommended as the nonpermissive temperature. As mentioned above, some investigators use 38°C or 39°C instead of the standard accepted 37°C, with an

aim to halt proliferation and enhance differentiation. The higher temperature matches the body temperature of the mouse (38–39°C). However, as also suggested by Mundel et al. [36], increasing the nonpermissive temperature to 39°C increases cell death. Thus, it appears that the influence of a higher temperature on the survival of differentiating cells has yet to be rigorously tested. More detailed examination of the dependence of cell maturation status on the length of culturing under nonpermissive conditions would be also quite useful, as this sort of information seems to be lacking in the available literature.

Attachment Factors

Another important aspect in the propagation and differentiation of immortalized podocytes represents the treatment of the culture dish surface with attachment factors. In principle, most investigators have maintained podocytes in culture dishes coated with collagen type I, simply because of its commercial availability. However, the main structural protein of the glomerular basement membrane is collagen type IV [42].

Cybulsky et al. [43] investigated the effects of various extracellular matrices, including collagens I and IV, on both adhesion and proliferation of extensively subcultured (spontaneously immortalized?) rat glomerular epithelial cells. No significant difference in cell adhesion to various substrates was found. Collagen type I in the form of a gel supported the cell proliferation most effectively. Thin films of both collagen type I and collagen type IV in equivalent amounts were also able to support proliferation, to a similar extent.

Mundel et al. [17] also tested the influence of the provided substrate (type I and IV collagens, uncoated plastic, and positively charged Falcon Primaria dishes) on growth and differentiation of primary cultured rat and human podocytes. The choice of the plating substrate had no qualitative influence on the phenotypic conversion of primary cultured podocytes from cobblestones into arborized cells. Bijian et al. [44] documented that both collagen type I and collagen type IV serve as attachment factors for primary cultured rat podocytes more effectively than laminin or uncoated plastic and also enhance cell survival after puromycin-induced damage.

Currently, a comprehensive comparison of the influence of type I and IV (canine NC1 hexamers) collagens on podocytes and bone marrow stromal cell (BMSC) differentiation has been documented by Perry et al. [42]. Murine conditionally immortalized podocytes differentiated into cells with a similar appearance regardless of

the collagen matrix used. Of the podocyte-specific proteins, WT-1 and myosin IIA were expressed in both undifferentiated and differentiated cells, while synaptopodin, actin, and α -actinin were expressed in differentiated cells only, all of them regardless of the collagen matrix used. However, CD2AP staining and its pattern were dependent on the type of matrix: while on collagen type I, only mature podocytes expressed CD2AP, on type IV collagen, both undifferentiated and differentiated podocytes were positive for CD2AP, but the positivity changed from diffuse cytoplasmic to cell peripheral localization which better corresponds to an *in vivo* association with the slit diaphragm complex. Surprisingly, no cells on any matrix synthesized podocin.

This same study [42] also showed canine BMSCs differentiating into podocyte-like cells when cultured on type I and type IV collagens. These cells expressed the podocyte-specific proteins such as WT-1, synaptopodin, actin, α -actinin, and myosin IIA on both matrices, but the number of cells expressing these proteins was much higher on type IV collagen as compared with collagen type I. Furthermore, the expression of CD2AP in the BMSC-derived podocytes was localized to the cell periphery on collagen type IV, but was localized as weak and diffuse cytoplasmic staining on collagen type I. As in podocytes, no BMSC-derived cells were indicative of podocin. The BMSCs cultured on uncoated plastic tended to resemble undifferentiated podocyte cell lines.

Taken together, accumulated evidence suggests that although collagen type IV should be a more physiological attachment substrate than collagen type I, there is practically little difference between these two substrates in terms of their effects on podocyte adhesion, differentiation, and growth *in vitro*. On the other hand, collagen type IV can enhance the differentiation of mesenchymal precursors into podocytes much more so than collagen type I.

Immortalized Podocyte Models Mimicking Dynamic Environment in Renal Glomeruli

Podocytes *in vivo* are exposed to mechanical forces, arising from glomerular capillary pressure and glomerular filtration [45]. In order to imitate physiological and pathophysiological intraglomerular conditions, immortalized mouse podocytes have recently been tested in conjunction with various mechanical and fluid shear stress models [46–48]. In order to create a stretch stress model [46], differentiated conditionally immortalized mouse podocytes, prepared as reported by Mundel et al. [36], were seeded onto flexible silicone membranes coated with collagen type I and covered with culture medium.

After cell attachment, the membrane was mounted on a Plexiglas manifold connected to a custom-built apparatus that produced cyclic pressure variations. The pressure variations caused upward and downward motion of the silicone membranes that transmitted biaxial cyclic mechanical stress to podocytes.

Fluid shear stress experiments can also be performed using a model described by Friedrich et al. [48]. Before an experiment, the conditionally immortalized differentiated murine podocytes were allowed to seed onto collagen type IV-coated glass coverslips and kept for 3–5 days until they formed a confluent monolayer. Thereafter, the coverslips were fixed in a flow chamber, where an appropriate flow of culture media was generated by a connected pump. All these experiments with the flow chamber were performed in the incubator at 37°C.

Human Immortalized Podocytes

In contrast to the amount of work on murine podocytic lines, a smaller number of studies have appeared to date that used immortalized podocytes of human origin. One of the first human podocyte lines that has been established is from a 1-month-old baby kidney, described by Delarue et al. [34]. The glomerular visceral epithelial cells were obtained by collagenase digestion of glomeruli isolated from a normal human baby kidney (judged to be unsuitable for transplantation); subsequently, the cells were transfected in vitro. As the transforming (immortalizing) genes, both the oncogenes T-SV40 and Ha-ras were introduced into the cells by the calcium phosphate procedure [49]. Immortalized cells were maintained in 1:1 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F12 medium supplemented with dexamethasone, insulin, transferrin, sodium selenate, and 1% FCS at a temperature of 37°C. Incorporation and expression of both transforming genes were then tested. Only T-SV40 was detected at the protein level; in contrast, Ha-ras failed to be transcribed, although it was integrated into the cell genome. As compared with parental nontransfected cells, the established cell line, marked as 56/10A1, displayed some variations in morphology (smaller cells with leaky junctions and large intercellular spaces). However, the majority of these features were also reported in podocyte lines derived from SV40 transgenic mice [33]. Despite some morphological abnormalities and enhanced proliferation capability, the immortalized cells expressed several determinants currently considered specific for differentiated glomerular visceral epithelial cells, i.e., PHM5, CALLA (common acute lymphoblastic leukemia antigen), and cytokeratin [50, 51], and retained the phenotype

for over 50 successive passages. However, cytokeratin was expressed with no evident pattern of filaments, in contrast to differentiated epithelial cells. Importantly, in order to confirm the podocyte phenotype, some later published studies reported expression of WT-1, the main universal podocyte marker, in this cell line [52]. This specific cell line retains the ability to proliferate due to the presence of the T-SV40 gene and/or its origin from a 1-month-old kidney, and, simultaneously, its potential to differentiate seems to be somewhat improved, although still limited. Perhaps the presence of Ha-ras in the genome, although not expressed, can positively influence differentiation, as reported by Amsterdam et al. [53] for similarly transformed ovarian granulosa cells.

Another conditionally immortalized human podocyte cell line, created by Saleem et al. [54], is more widely used. Unlike the establishment of the cell line 56/10A1 described above, in this study the glomeruli were harvested from a nephrectomy specimen of a 3-year-old child, taken due to a unilateral antenatal obstructive/reflux nephropathy. The cultures of primary human podocytes were infected by a retrovirus carrying a construct consisting of a SV40 TAG gene containing both the tsA58 and U19 mutations. In a manner similar to the murine cell lines, the cells were propagated at 33°C, and their differentiation was induced by maintenance on collagen type I at the nonpermissive temperature of 37°C for 7–14 days. Throughout this period, the podocyte-specific markers WT-1, synaptopodin, and nephrin were detected in the cultured cells [54, 55].

During 2005 alone, approximately twenty-seven studies were published, where immortalized podocyte cell lines were used, in comparison to merely one paper that was published on the use of primary podocyte cultures and yet one more paper, where the authors used both the immortalized murine podocyte cell line as well as murine and rat primary cultures [56]. In contrast, in 1997, two papers with experiments on primary cultured podocytes and one paper describing the use of an immortalized cell line were published. Studies using immortalized podocyte cultures appear to prevail nowadays. Work with these lines is certainly more convenient as compared with primary culture experiments. However, one should always keep in mind that these cells in general represent an experimental model with a high degree of artificiality, as they have been derived by means of unnatural gene insertion into the cellular genome. Accordingly, the experimental data obtained with these cells should be interpreted with a certain caution and, at best, should be reproduced in a different model.

Podocyte Cultures from Urine

In the urinary sediment from some patients with kidney disease, Pascual et al. [57] and Hara et al. [58] detected elements positive for the C3b complement receptor 1 and podocalyxin, respectively. This suggests that some podocyte fragments or complete podocyte bodies can be shed into urine, although both markers are not fully specific for podocytes. In further studies, other authors [59, 60] have confirmed the presence of podocalyxin-positive cells in the urine in a variety of other experimental and human glomerular diseases. This is in line with the idea that during certain glomerulopathies injured podocytes can detach from the glomerular basement membrane and be released into the urine. However, there was a lack of direct evidence that the podocalyxin-positive cells were genuine podocytes. Moreover, the viability of these cells was not tested. Vogelmann et al. [61] were the first who successfully cultured human urinary cells that were identified as podocytes. Freshly voided urine, both from patients with glomerulopathies and healthy control subjects, was repeatedly centrifuged and the pellet resuspended in sterile human diploid fibroblast solution; finally, the pellet was resuspended in DMEM/Ham's F-12 with 10% FBS supplemented with antibiotics. The cells were routinely plated on plastic, because it was found that various attachment factors such as collagen, fibronectin, and laminin had no apparent influence on cell growth. This is somewhat surprising, because these attachment factors, collagen in particular, are considered important stimuli for proper adhesion, growth, and survival of the nonurinary podocytes [e.g., 43, 44, but see 17]. The results of Vogelmann et al. [61] showed that podocytes exist in urine, independently of whether the urine was obtained from healthy subjects or from patients with both active or inactive glomerulopathies; all cells were viable and able to grow in vitro.

The growth pattern of urinary podocytes seems to be very similar to that of primary cells migrating out from explanted glomeruli or to that of immortalized human podocyte lines, as within a few days, colonies made of cobblestone-like cells appear. After 1–2 weeks of growth, many of the cells underwent apoptosis, while the remaining elements differentiated, as indicated by the development of cell processes. Interestingly, the urinary cells from patients with active glomerular diseases showed rapid proliferation, until a subpopulation of them underwent apoptosis, while the rest of them developed processes. After several trypsinization treatments

and replating, they again grew to confluence, indicating a high proliferation potential. In contrast, the urinary cultures from both healthy persons and subjects with inactive glomerulopathies displayed smaller cell colonies; also the cells proliferated shorter, died sooner in culture, and did not survive replating. Vogelmann et al. [61] speculated that the podocytes from controls or from patients with inactive diseases, unlike those from patients with active glomerulopathies, are shed because they are senescent, resulting in the limited proliferation potential. Another idea we can offer, inspired by some alternate in vivo studies, is that podocytes in active glomerular disease undergo dedifferentiation in response to some intraglomerular damaging factors which can give them a higher proliferation capability. As far as the identification of the cells cultured by Vogelmann et al. [61] is considered, these cells expressed some podocyte-specific markers such as podocalyxin, podocin, WT-1, synaptopodin, and P-cadherin. However, there was no evidence for GLEPP-1, another podocytic marker. Interestingly, the nuclear-localized universal podocytic marker WT-1 tended to disappear within a few weeks which is never seen with nonurinary podocytes. Some cells positive for podocytic markers (WT-1 and podocin) coexpressed markers of other cellular types such as cytokeratin-8 (tubular epithelial cells) or α -smooth muscle actin (myofibroblasts, mesangial cells) which may indeed suggest dedifferentiation and/or transdifferentiation of cultured podocytes.

Petermann et al. [62, 63] and Yu et al. [64] studied rat urinary podocytes in culture. In addition to healthy control rats, they used rats with passive Heymann nephritis (model of experimental membranous nephropathy) [62], streptozotocin-induced diabetic nephropathy [63], as well as puromycin-aminonucleoside-induced nephrosis (model of minimal-change nephropathy), anti-Thy 1.1 nephritis (model of mesangioproliferative nephritis), and five-sixths nephrectomy (model of hypertensive progressive renal damage) [all in 64]. In these studies, rat urine was collected for 12 or 24 h or obtained by means of bladder puncture, following diuresis forced by intravenous injection of saline. The urine samples were partially neutralized by combining with Hanks' balanced salt solution; the cells were collected by centrifugation, resuspended in the culture medium (DMEM, 10% FBS supplemented with antibiotics), and plated onto a collagen type I substrate. The adherent cells were subsequently grown in the same culture medium, but containing 5% FBS. While no viable podocytes were found in the urine from healthy control rats, in the urine

of rats with passive Heymann nephritis, viable cells were present that proliferated *ex vivo*, until a subset of them underwent apoptosis after day 4 in culture. Such an apoptotic crisis of podocytic cultures is consistent with the observation of Vogelmann et al. [61] on human urinary podocytes.

Petermann et al. [62] also attempted to confirm the expression of both mRNA and protein for the podocyte-specific markers. The adherent cells strongly expressed nephrin, podocin, and also GLEPP-1 that was not expressed in human urine podocytes [61]. Surprisingly, no mRNA for nephrin was detected. Synaptopodin showed only weak positivity, and no WT-1 protein was expressed, although WT-1 mRNA was present in the cells; these findings correspond to the results obtained by Vogelmann et al. [61]. The weak or missing expression of these proteins controlling and/or indicating the differentiation status of podocytes can perhaps be explained by certain dedifferentiation associated with proliferation of podocytes. No coexpression of the podocyte markers with any markers of other cell types (sign of transdifferentiation) was detected. Another interesting piece of information presented in the study of Petermann et al. [62] is that the results were the same independently of whether either fresh or several-hour-old urine was used. This is indicative that podocytic elements are not damaged by a prolonged stay in the urine. Further studies done by Petermann et al. [63] and Yu et al. [64] using other models of experimental rat nephropathies yielded identical or very similar results.

Importantly, detection of podocytes in the urine is suggested by numerous studies [reviewed in 65] as a promising marker of the activity of glomerular diseases. Obviously, for routine detection of urinary podocytes, techniques like immunocytochemistry or fluorescence-activated cell sorting of the urinary sediment would be more suitable than cultures of urinary podocytes which, in turn, are more eligible for basic research.

Identification of Cultured Podocytes

The proper identification of cultured cells and confirmation of their phenotype nowadays represent an integral part of any *in vitro* cell culture technique. Originally, the main and single criterion for identification of cultured podocytic cells was the cellular morphology, as seen under the phase-contrast microscope. From the current point of view, identification based on cellular morphology is quite uncertain, since the observed shape

of both primary cultured cells and immortalized cell lines depends on many variables, including culture conditions; additionally, the cellular form can grossly differ from that observed *in vivo*. Currently, morphology is only a subsidiary criterion for cell identification. It is nevertheless generally accepted that the small, polygonal cells with a cobblestone-like appearance are dedifferentiated proliferating podocytes, while the large, branched, and often binucleated arborized cells are mature podocytes [17]. It should be noted here that many studies in the past were actually performed on immature podocytes.

Another obsolete method for phenotype confirmation of cultured podocytes was based on a selectively toxic effect of puromycin aminonucleoside on this cellular type [reviewed in 51]. However, results of this selection were rather inconsistent; additionally, the positively marked cells – podocytes – could not be utilized for further experiments, because they were damaged by puromycin.

In current research practice, cultured cells are most properly identified by means of immunochemical detection (immunocytochemistry, immunofluorescence) of a protein that should be expressed exclusively by podocytes. The choice of proteins as podocyte markers has been somewhat changing over time, as it was found that some of these markers are not specific for podocytes, or their expression was found variable. For example, in the past, the C3b complement receptor-1 [51, 66] and the common acute lymphoblastic leukemia antigen [67] were used widely as podocytic markers. However, for both proteins, some discrepancies between the expression *in vivo* and that *in vitro* have been found, and reports on their expression in cultured podocytes have been rather contradictory [68]. For these reasons, they have been used with decreasing frequency.

The proteins most often used as podocytic markers in current research efforts are summarized in table 1 [69–96]. WT-1 is considered a universal marker for both undifferentiated and differentiated podocytes; however, it should be noted that the protein has been also found in parietal epithelial cells [97] and parietal podocytes [72] *in vivo*. In addition, some researchers use yet other molecules for identification of both podocyte types, such as a cell membrane localized O-acetyl GD3 ganglioside [98] or the secreted vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor [99].

In order to confirm the podocyte phenotype, the majority of working groups use a palette of three to five podocyte-specific markers. It is our opinion that the op-

Table 1. Summary of the recently most often used markers of podocytic phenotype in vitro

Marker	Characterization	Localization in cultured podocytes	Presence in other cells/organs	Function in podocytes/glomerulus/organ	Ref.
Wilms' tumor protein (WT-1)	52–65 kDa, four zinc finger transcription factor	<i>Immature and mature podocytes</i> Nuclear localization	Parietal podocytes in vivo Ovaries, testes (developing, mature) Bone marrow cells Neurons	Regulation of nephrogenesis Induction and maintenance of mesenchymal-epithelial transition during glomerulogenesis Maintenance of podocyte mature phenotype	69–72
Glomerular epithelial protein-1 (GLEPP-1)	200–205 kDa, receptor-like membrane protein, tyrosine phosphatase	<i>Mature podocytes</i> Apical membrane, especially the surface of foot processes	Neurons in developing brain – mRNA detected only	Regulation of structure and function of foot processes	73–76
Podocalyxin (also called PHM-5 antigen)	140 kDa, membrane sialoprotein	<i>Mature podocytes</i> Apical membrane	Glomerular endothelium Vascular endothelium Erythrocytes Platelets Megakaryocytes	Role in maintaining podocyte separation through charge repulsion	77–81
Synaptopodin (also called pp 44)	100, 110 kDa, proline-rich actin-associated protein	<i>Mature podocytes</i> Cytoskeleton in major and foot processes	Neurons	Role in maintenance of actin-based shape Role in maintenance and motility of foot processes	82, 83
α -Actinin-4	100 kDa, member of the superfamily of actin-binding proteins	<i>Mature podocytes</i> Cytoskeleton in foot processes	Renal capillaries Blood vessels Uterus Colon Pancreas	Formation of foot processes Stabilization of cell adhesion Role in cell motility	84–87
Nephrin (also called 5-1-6 antigen)	180 kDa, transmembrane protein of the immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules	<i>Immature and mature podocytes</i> Slit diaphragm	Brain Pancreas	Maintenance of structure of foot processes and slit diaphragm Interaction with podocin and CD2AP	54, 88–91
Podocin	42 kDa, transmembrane protein of the immunoglobulin superfamily	<i>Mature podocytes</i> Slit diaphragm	No	Stabilization of slit diaphragm Interaction with nephrin and CD2AP	54, 92–94
CD2-associated protein (CD2AP)	80 kDa, transmembrane protein of the immunoglobulin superfamily	<i>Mature podocytes</i> Slit diaphragm	Renal tubular cells Cells of collecting ducts	Formation and stabilization of slit diaphragm Role as connector protein between nephrin, podocin, and cytoskeleton	95, 96

Table 2. Summary of benefits and limits of each type of culture method

	Primary culture	Immortalized cell lines	Human podocytes
Benefits	Natural genome more compatible with in situ cells	Continuous maintenance of cells due to unlimited proliferation Controlled switch to differentiation	Cells damaged in situ by appropriate pathogenetic factors
Limits	Limited proliferation of cells Time- and number-restricted maintenance of cultured cells	Insertion of unnatural immortalizing gene into cell genome may cause phenotype alterations	Yielded as artificially dedifferentiated/transdifferentiated cells

timal approach is the detection of several mature podocyte markers from different cell compartments (i.e., a protein of apical membrane, foot process/slit diaphragm, cytoskeleton, a secreted protein) in combination with WT-1 as a marker for both immature/mature podocytes.

Conclusions

For research into podocyte function under normal or pathogenic conditions, a growing array of in vitro systems is available nowadays, ranging from classical primary cul-

tures, which now seem to be underestimated by some investigators, through convenient but rather artificial immortalized cell lines to quite unconventional cultivations of podocytes from animal or human urine. Each of these alternatives has its own advantages and limitations (table 2). Certainly, a combination of several different in vitro systems together, with obtainable evidence in vivo, can best assure the relevance of experimental data to the biology of podocytes. This considerable research interest has been driven mainly by the need for better protection and recovery of these cells in renal diseases. Any further re-

search efforts leading us to a better understanding of podocyte biology and pathophysiology are most welcome.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Grant Agency of Charles University in Prague, No. 31/2004, and by the Research Plan MSM 0021620807 of the Ministry of Education, Czech Republic. Proofreading and editing of the manuscript by native English speakers with related background in BioMed Proofreading are acknowledged.

References

- Pavenstädt H: Roles of the podocyte in glomerular function. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:F173-F179.
- Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003;83:253-307.
- Shirato I, Hosser H, Kimura K, Sakai T, Tomino Y, Kriz W: The development of focal segmental glomerulosclerosis in Masugi nephritis is based on progressive podocyte damage. *Virchows Arch* 1996;429:255-273.
- Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplon NS, Sun L, Meyer TW: Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest* 1997;99:342-348.
- Mundel P, Kriz W: Cell culture of podocytes. *Exp Nephrol* 1996;4:263-266.
- Shankland SJ: The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006;69:2131-2147.
- Kraker CA, Greenspon SA: Factors leading to variation in concentration of nephrotoxic antigen(s) of glomerular basement membrane. *AMA Arch Pathol* 1954;58:401-432.
- Burlington H, Cronkite EP: Characteristics of cell cultures derived from renal glomeruli. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973;142:143-149.
- Holdsworth SR, Glasgow EF, Atkins RC, Thomson NM: Cell characteristics of cultured glomeruli from different animal species. *Nephron* 1978;22:454-459.
- Striker GE, Killen PD, Farin FM: Human glomerular cells in vitro: isolation and characterization. *Transplant Proc* 1980;12(suppl 1):88-99.
- Kreisberg JJ, Hoover RL, Karnovsky MJ: Isolation and characterization of rat glomerular epithelial cells in vitro. *Kidney Int* 1978;14:21-30.
- Harper PA, Robinson JM, Hoover RL, Wright TC, Karnovsky MJ: Improved methods for culturing rat glomerular cells. *Kidney Int* 1984;26:875-880.
- Quigg RJ, Cybulsky AV, Jacobs JB, Salant DJ: Anti-Fx1A produces complement-dependent cytotoxicity of glomerular epithelial cells. *Kidney Int* 1988;34:43-52.
- Johnson R, Yamabe H, Chen YP, Campbell C, Gordon K, Baker P, Lovett D, Couser WG: Glomerular epithelial cells secrete a glomerular basement membrane-degrading metalloproteinase. *J Am Soc Nephrol* 1992;2:1388-1397.
- Weinstein T, Cameron R, Katz A, Silverman M: Rat glomerular epithelial cells in culture express characteristics of parietal, not visceral, epithelium. *J Am Soc Nephrol* 1992;3:1279-1287.
- Yaoita E, Kurihara H, Sakai T, Ohshiro K, Yamamoto T: Phenotypic modulation of parietal epithelial cells of Bowman's capsule in culture. *Cell Tissue Res* 2001;304:339-349.
- Mundel P, Reiser J, Kriz W: Induction of differentiation in cultured rat and human podocytes. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:697-705.
- Bridgewater DJ, Matsell DG: Insulin-like growth factor binding protein-2 modulates podocyte mitogenesis. *Pediatr Nephrol* 2003;18:1109-1115.
- Bridgewater DJ, Ho J, Sauro V, Matsell DG: Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway. *Kidney Int* 2005;67:1308-1314.
- Jat PS, Sharp PA: Large T antigens of simian virus 40 and polyomavirus efficiently establish primary fibroblasts. *J Virol* 1986;59:746-750.
- Frederiksen K, Jat PS, Valtz N, Levy D, McKay R: Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron* 1988;1:439-448.
- Burns JS, Lemoine L, Lemoine NR, Williams ED, Wynford-Thomas D: Thyroid epithelial cell transformation by a retroviral vector expressing SV40 large T. *Br J Cancer* 1989;59:755-760.
- Ridley AJ, Paterson HF, Noble M, Land H: Ras-mediated cell cycle arrest is altered by nuclear oncogenes to induce Schwann cell transformation. *EMBO J* 1988;7:1635-1645.
- Spanopoulou E, Early A, Elliott J, Crispe N, Ladyman H, Ritter M, Watt S, Grosveld F, Kioussis D: Complex lymphoid and epithelial thymic tumours in Thyl-myc transgenic mice. *Nature* 1989;342:185-189.
- Jat PS, Noble MD, Ataliotis P, Tanaka Y, Yannoutsos N, Larsen L, Kioussis D: Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2K^b-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5096-5100.
- Petit CA, Gardes M, Feunteun J: Immortalization of rodent embryo fibroblasts by SV40 is maintained by the A gene. *Virology* 1983;127:74-82.
- Jat PS, Sharp PA: Cell lines established by a temperature-sensitive simian virus 40 large-T-antigen gene are growth restricted at the nonpermissive temperature. *Mol Cell Biol* 1989;9:1672-1681.
- Radna RL, Caton Y, Jha KK, Kaplan P, Li G, Traganos F, Ozer HL: Growth of immortal simian virus 40 tsA-transformed human fibroblasts is temperature dependent. *Mol Cell Biol* 1989;9:3093-3096.
- Baldwin AS Jr, Sharp PA: Binding of a nuclear factor to a regulatory sequence in the promoter of the mouse H-2K^b class I major histocompatibility gene. *Mol Cell Biol* 1987;7:305-313.
- David-Watine B, Israel A, Kourilsky P: The regulation and expression of MHC class I genes. *Immunol Today* 1990;11:286-292.
- Zaret KS, DiPersio CM, Jackson DA, Montigny WJ, Weinstat DL: Conditional enhancement of liver-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9076-9080.
- Dennis JE, Caplan AI: Bone marrow mesenchymal stem cells; in Sell S (ed): *Stem Cells Handbook*. Totowa, Humana Press, 2004, pp 107-117.

- 33 MacKay K, Striker LJ, Elliot S, Pinkert CA, Brinster RL, Striker GE: Glomerular epithelial, mesangial and endothelial cell lines from transgenic mice. *Kidney Int* 1988;33:677-684.
- 34 Delarue F, Virone A, Hagege J, Lacave R, Peraldi MN, Adida C, Rondeau E, Feunteun J, Sraer JD: Stable cell line of T-SV40 immortalized human glomerular visceral epithelial cells. *Kidney Int* 1991;40:906-912.
- 35 Ardaillou N, Lelongt B, Turner N, Piedagnel R, Baudouin B, Estrade S, Cassingena R, Ronco PM: Characterization of a simian virus 40-transformed human podocyte cell line producing type IV collagen and exhibiting polarized response to atrial natriuretic peptide. *J Cell Physiol* 1992;152:599-616.
- 36 Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, Pavenstadt H, Davidson GR, Kriz W, Zeller R: Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 1997;236:248-258.
- 37 Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, ten Dijke P, Mundel P, Böttinger EP: Apoptosis in podocytes induced by TGF- β and Smad7. *J Clin Invest* 2001;108:807-816.
- 38 Wada T, Pippin JW, Marshall CB, Griffin SV, Shankland SJ: Dexamethasone prevents podocyte apoptosis induced by puromycin aminonucleoside: role of p53 and Bcl-2-related family proteins. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2615-2625.
- 39 Welsch T, Endlich N, Kriz W, Endlich K: CD2AP and p130Cas localize to different F-actin structures in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:F769-F777.
- 40 Vega-Warner V, Ransom RF, Vincent AM, Brosius FC, Smoyer WE: Induction of antioxidant enzymes in murine podocytes precedes injury by puromycin aminonucleoside. *Kidney Int* 2004;66:1881-1889.
- 41 Ransom RF, Lam NG, Hallett MA, Atkinson SJ, Smoyer WE: Glucocorticoids protect and enhance recovery of cultured murine podocytes via actin filament stabilization. *Kidney Int* 2005;68:2473-2483.
- 42 Perry J, Tam S, Zheng K, Sado Y, Dobson H, Jefferson B, Jacobs R, Thorner PS: Type IV collagen induces podocytic features in bone marrow stromal stem cells in vitro. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:66-76.
- 43 Cybulsky AV, Bonventre JV, Quigg RJ, Wolfe LS, Salant DJ: Extracellular matrix regulates proliferation and phospholipid turnover in glomerular epithelial cells. *Am J Physiol* 1990;259(2 Pt 2):F326-F337.
- 44 Bijian K, Takano T, Papillon J, Khadir A, Cybulsky AV: Extracellular matrix regulates glomerular epithelial cell survival and proliferation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F255-F266.
- 45 Endlich N, Endlich K: Stretch, tension and adhesion-adaptive mechanisms of the actin cytoskeleton in podocytes. *Eur J Cell Biol* 2006;85:229-234.
- 46 Endlich N, Kress KR, Reiser J, Uttenweiler D, Kriz W, Mundel P, Endlich K: Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:413-422.
- 47 Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Monkawa T, Durvasula R, Couser WG, Shankland SJ: Mechanical stress reduces podocyte proliferation in vitro. *Kidney Int* 2002;61:40-50.
- 48 Friedrich C, Endlich N, Kriz W, Endlich K: Podocytes are sensitive to fluid shear stress in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F856-F865.
- 49 Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R: Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* 1978;14:725-731.
- 50 Hancock WW, Atkins RC: Monoclonal antibodies to human glomerular cells: a marker for glomerular epithelial cells. *Nephron* 1983;33:83-90.
- 51 Striker GE, Striker LJ: Glomerular cell culture. *Lab Invest* 1985;53:122-131.
- 52 Krishnamurti U, Zhou B, Fan WW, Tsilibary E, Wayner E, Kim Y, Kashtan CE, Michael A: Puromycin aminonucleoside suppresses integrin expression in cultured glomerular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:758-766.
- 53 Amsterdam A, Zauberman A, Meir G, Pinhasi-Kimhi O, Suh BS, Oren M: Cotransfection of granulosa cells with simian virus 40 and Ha-RAS oncogene generates stable lines capable of induced steroidogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7582-7586.
- 54 Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, Xing CY, Ni L, Mathieson PW, Mundel P: A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:630-638.
- 55 Saleem MA, Ni L, Witherden I, Tryggvason K, Ruotsalainen V, Mundel P, Mathieson PW: Co-localization of nephrin, podocin, and the actin cytoskeleton. *Am J Pathol* 2002;161:1459-1466.
- 56 Vaughan MR, Pippin JW, Griffin SV, Krofft R, Fleet M, Haseley L, Shankland SJ: ATRA induces podocyte differentiation and alters nephrin and podocin expression in vitro and in vivo. *Kidney Int* 2005;68:133-144.
- 57 Pascual M, Steiger G, Sadallah S, Paccaud JP, Carpentier JL, James R, Schifferli JA: Identification of membrane-bound CR1 (CD35) in human urine: evidence for its release by glomerular podocytes. *J Exp Med* 1994;179:889-899.
- 58 Hara M, Yamamoto T, Yanagihara T, Takada T, Itoh M, Adachi Y, Yoshizumi A, Kawasaki K, Kihara I: Urinary excretion of podocalyxin indicates glomerular epithelial cell injuries in glomerulonephritis. *Nephron* 1995;69:397-403.
- 59 Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, Koide H: Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1379-1383.
- 60 Nakamura T, Ushiyama C, Shimada N, Sekizuka K, Ebihara I, Hara M, Koide H: Effect of cyclophosphamide or azathioprine on urinary podocytes in patients with diffuse proliferative lupus nephritis. *Nephron* 2001;87:192-193.
- 61 Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV: Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F40-F48.
- 62 Petermann AT, Krofft R, Blonski M, Hiromura K, Vaughn M, Pichler R, Griffin S, Wada T, Pippin J, Durvasula R, Shankland SJ: Podocytes that detach in experimental membranous nephropathy are viable. *Kidney Int* 2003;64:1222-1231.
- 63 Petermann AT, Pippin J, Krofft R, Blonski M, Griffin S, Durvasula R, Shankland SJ: Viable podocytes detach in experimental diabetic nephropathy: potential mechanism underlying glomerulosclerosis. *Nephron Exp Nephrol* 2004;98:e114-e123.
- 64 Yu D, Petermann AT, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, Floege J: Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1733-1741.
- 65 Mundel P: Urinary podocytes: lost and found alive. *Kidney Int* 2003;64:1529-1530.
- 66 Kreisberg JJ, Karnovsky MJ: Glomerular cells in culture. *Kidney Int* 1983;23:439-447.
- 67 Ivanov A, Paltsev M: Common acute lymphoblastic leukemia antigen expression on visceral epithelial cells in several types of glomerulonephritis. *Pathol Res Pract* 1993;189:940-945.
- 68 van der Woude FJ, Michael AF, Muller E, van der Hem GK, Vernier RL, Kim Y: Lymphohaemopoietic antigens of cultured human glomerular epithelial cells. *Br J Exp Pathol* 1989;70:73-82.
- 69 Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B: Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 1993;119:1329-1341.
- 70 Roberts SG: Transcriptional regulation by WT1 in development. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:542-547.

- 71 Scholz H, Kirschner KM: A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. *Physiology (Bethesda)* 2005;20:54-59.
- 72 Bariety J, Mandet C, Hill GS, Bruneval P: Parietal podocytes in normal human glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2770-2780.
- 73 Thomas PE, Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Holzman LB, Wiggins RC: GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit. *J Biol Chem* 1994;269:19953-19962.
- 74 Wiggins RC, Wiggins JE, Goyal M, Wharram BL, Thomas PE: Molecular cloning of cDNAs encoding human GLEPP1, a membrane protein tyrosine phosphatase: characterization of the GLEPP1 protein distribution in human kidney and assignment of the GLEPP1 gene to human chromosome 12p12-p13. *Genomics* 1995;27:174-181.
- 75 Tagawa M, Shirasawa T, Yahagi Y, Tomoda T, Kuroyanagi H, Fujimura S, Sakiyama S, Maruyama N: Identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in postmitotic maturing neurons: its structure and expression in the central nervous system. *Biochem J* 1997;321:865-871.
- 76 Wang R, St John PL, Kretzler M, Wiggins RC, Abrahamson DR: Molecular cloning, expression, and distribution of glomerular epithelial protein 1 in developing mouse kidney. *Kidney Int* 2000;57:1847-1859.
- 77 Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG: Identification and characterization of podocalyxin - the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 1984;98:1591-1596.
- 78 Kerjaschki D, Poczewski H, Dekan G, Horvat R, Balzar E, Kraft N, Atkins RC: Identification of a major sialoprotein in the glycocalyx of human visceral glomerular epithelial cells. *J Clin Invest* 1986;78:1142-1149.
- 79 Horvat R, Hovorka A, Dekan G, Poczewski H, Kerjaschki D: Endothelial cell membranes contain podocalyxin - the major sialoprotein of visceral glomerular epithelial cells. *J Cell Biol* 1986;102:484-491.
- 80 Kershaw DB, Thomas PE, Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Whiteside CI, Wiggins RC: Molecular cloning, expression, and characterization of podocalyxin-like protein 1 from rabbit as a transmembrane protein of glomerular podocytes and vascular endothelium. *J Biol Chem* 1995;270:29439-29446.
- 81 Miettinen A, Solin ML, Reivinen J, Juvonen E, Vaisanen R, Holthofer H: Podocalyxin in rat platelets and megakaryocytes. *Am J Pathol* 1999;154:813-822.
- 82 Mundel P, Gilbert P, Kriz W: Podocytes in glomerulus of rat kidney express a characteristic 44 kD protein. *J Histochem Cytochem* 1991;39:1047-1056.
- 83 Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Kruger M, Reiser J, Kriz W: Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 1997;139:193-204.
- 84 Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H, Yamada Y, Chiba H, Hirohashi S: Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol* 1998;140:1383-1393.
- 85 Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, Mathis BJ, Rodriguez-Perez JC, Allen PG, Beggs AH, Pollak MR: Mutations in ACTN4, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000;24:251-256.
- 86 Ichimura K, Kurihara H, Sakai T: Actin filament organization of foot processes in rat podocytes. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1589-1600.
- 87 Rinta-Valkama J, Aaltonen P, Lassila M, Palmen T, Tossavainen P, Knip M, Holthofer H: Densin and filtrin in the pancreas and in the kidney, targets for humoral autoimmunity in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2007;23:119-126.
- 88 Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K: Positionally cloned gene for a novel glomerular protein - nephrin - is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998;1:575-582.
- 89 Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestila M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K: Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7962-7967.
- 90 Holzman LB, St John PL, Kovari IA, Verma R, Holthofer H, Abrahamson DR: Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int* 1999;56:1481-1491.
- 91 Putaala H, Soininen R, Kilpelainen P, Wartiovaara J, Tryggvason K: The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 2001;10:1-8.
- 92 Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Naudet P, Antignac C: NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000;24:349-354.
- 93 Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, Shaw AS, Holzman LB, Mundel P: Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001;108:1621-1629.
- 94 Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Sakai T, Shimizu F: Cloning of rat homologue of podocin: expression in proteinuric states and in developing glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 2003;13:46-56.
- 95 Li C, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Shaw AS, Miner JH: CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F785-F792.
- 96 Shih NY, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw AS: CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol* 2001;159:2303-2308.
- 97 Yang Y, Jeanpierre C, Dressler GR, Lacoste M, Naudet P, Gubler MC: WT1 and PAX-2 podocyte expression in Denys-Drash syndrome and isolated diffuse mesangial sclerosis. *Am J Pathol* 1999;154:181-192.
- 98 Reivinen J, Holthofer H, Miettinen A: A cell-type specific ganglioside of glomerular podocytes in rat kidney: an O-acetylated GD3. *Kidney Int* 1992;42:624-631.
- 99 Foster RR, Hole R, Anderson K, Satchell SC, Coward RJ, Mathieson PW, Gillatt DA, Saleem MA, Bates DO, Harper SJ: Functional evidence that vascular endothelial growth factor may act as an autocrine factor on human podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:F1263-F1273.

Kratochvilova M, Zakiyanov O, Kalousova M, Kriha V, Zima T, Tesar V. Associations of serum levels of advanced glycation end products with nutrition markers and anemia in patients with chronic kidney disease.

Renal Failure, 33(2): 131–137, (2011)
Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.
ISSN 0886-022X print/1525-6049 online
DOI: 10.3109/0886022X.2010.541581

informa
healthcare

CLINICAL STUDY

Associations of Serum Levels of Advanced Glycation end Products with Nutrition Markers and Anemia in Patients with Chronic Kidney Disease

Markéta Kratochvilová^{1,2}, Oskar Zakiyanov^{1,2}, Marta Kalousová², Vítězslav Kříha³,
Tomáš Zima² and Vladimír Tesar¹

¹Department of Nephrology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic; ²Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic; ³Department of Physics, Faculty of Electrical Engineering, Czech Technical University in Prague, Prague, Czech Republic

Abstract

Background: Advanced glycation end product (AGE) levels are elevated in patients with decreased renal function and may contribute to the excessive cardiovascular disease in this population. However, their relation to nutrition, anemia, and micro inflammation is not well characterized. The aim of this study is to determine their relationship in patients with chronic kidney disease (CKD). **Methods:** The studied group consisted of 203 subjects: 159 patients with CKD 1–5 and 44 healthy control subjects. AGE levels were assessed by spectrofluorimetry, and routine biochemical parameters were measured using standard methods. **Results:** AGE levels were significantly increased in CKD patients compared with controls ($3.9 \pm 1.7 \times 10^5$ AU in CKD 1–5 patients vs. $3.2 \pm 0.48 \times 10^5$ AU in controls; $p < 0.0001$). AGE levels increased from CKD 3. AGE levels were positively associated with age, albumin, prealbumin, and oxosomucoid, and were negatively associated with hemoglobin and estimated glomerular filtration rate. In multiple regression analysis, after adjustment to age and glomerular filtration rate, AGE levels remained independently correlated with albumin and prealbumin and negatively correlated with hemoglobin. **Conclusions:** This study is the demonstration that nutrition markers, albumin and prealbumin, are the positive determinants and hemoglobin is the negative determinant of serum AGE levels in patients with CKD.

Keywords: advanced glycation end products, chronic kidney disease, nutrition, anemia, atherosclerosis

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is associated with enhanced oxidative stress, which is assumed to accelerate the progression of renal and cardiovascular disease.^{1,2} The factors that affect the progression of CKD have been incompletely characterized. Advanced glycation end products (AGEs), the short- and long-term modification products of glycation or glycoxidation of proteins and lipids,^{3,4} are implicated in the pathogenesis of CKD, diabetes, and atherosclerosis.^{5,6}

AGE toxicity may occur through at least three mechanisms: interaction with the receptor for AGEs (RAGE), tissue deposition, and in situ glycation. AGEs trigger proinflammatory, profibrotic, and procoagulant cellular responses that are capable of damaging tissues, often targeting particular organs. In diabetic patients, the conditions needed to promote AGE formation are

all present and are further accentuated by accompanying renal failure.⁷

AGEs are also implicated in the pathophysiology of nondiabetic renal diseases and aging. AGEs have been found in renal tissues in IgA nephritis and lupus nephritis, hypertensive nephropathy, renal fibrosis, and chronic transplant rejection.^{6,8,9} The pivotal role of AGEs during glomerular and tubulointerstitial damage and in the development of complications due to decreased renal function is now increasingly recognized as well as their role in promoting local and inflammatory response in the kidney. The precise role in these different kidney pathologies has yet to be elucidated. In nondiabetic patients, the presence of AGEs could disrupt the balance between dietary intake, oxidation, in situ glycation, and renal elimination.

Oxidative stress, which occurs when there is excessive free-radical production or low antioxidant level, is

Address correspondence to Markéta Kratochvilová, Department of Nephrology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, U nemocnice 2, Praha 2, 128 08 Prague 2, Czech Republic. Tel.: +420 224 962 696, 224 962 574; Fax: +420 224 962 696; E-mail: mkazderova@centrum.cz

Received 18 August 2010; revised 19 October 2010; accepted 9 November 2010

implicated to be a factor for the development of endothelial dysfunction and atherogenesis.¹⁰ In this context, it is of interest that inflammatory response is associated with decreased levels of several antioxidants.¹¹ Similarly, during malnutrition, increased oxidative stress, in combination with chronic inflammation, and anemia might lead to increased risk of cardiovascular and renal disease.

Formation of AGEs is a ubiquitous process of protein modification and degeneration by sugar molecules and reactive intermediates of oxidant and carbonyl stress that occurs in situations where the biochemical equilibrium is shifted toward covalent interaction between the reaction partners. This effect is most prominent in diabetes mellitus (DM) and chronic renal failure characterized by uremic carbonyl stress when considerable amount of AGE-modified proteins accumulate in plasma and tissues.⁶

Despite advances in renal pathology, many important aspects of AGEs, their role in renal biology, and determinants of their levels still remain unclear.

This study aims to examine correlates of AGEs measured in a cohort of patients with CKD stages 1–5, not yet requiring dialysis. Specifically, we examine for the relationships between AGEs and markers of nutrition, anemia, and micro inflammation, whose associations have been previously reported or are biologically plausible.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

We recruited 159 patients at different stages of CKD at the Department of Nephrology (Charles University and General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic). The control group consisted of 44 healthy subjects. Written informed consent and laboratory samples were obtained from all subjects according to ethical guidelines. This study was approved by the local Institutional Ethical Committee.

Clinical, demographic, and biochemical characteristics of the group are presented in Table 1. The etiology of CKD was the following: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)-associated vasculitis (20%), hypertensive nephropathy (8%), lupus nephritis (14%), IgA nephritis (21%), diabetic nephropathy (4%), membranous nephropathy (15%), focal and segmental glomerulosclerosis or minimal change disease (11%), amyloidosis (5%), and other (1%). Patients were separated into five CKD groups according to their estimated glomerular filtration rate [eGFR; Modification of Diet in Renal Disease (MDRD)], based on Kidney Dialysis Outcomes Quality Initiative (K/DOQI), as follows: stage 5 (eGFR < 15 mL/min), stage 4 (eGFR 15–30 mL/min), stage 3 (30–60 mL/min); patients with CKD stage 1 and 2 were analyzed together (eGFR > 60 mL/min). History of cardiovascular disease (CVD) was taken from medical records of each patient, comprising ischemic heart disease,

Table 1. Clinical, demographic, and laboratory characteristics of the study group and controls.

Variable	Controls	CKD 1–5	CKD 1 + 2	CKD 3	CKD 4	CKD 5	p-Value by ANOVA for CKD 1–5
Number of patients	44	159	71	42	31	15	
Age (years) ^a	57 ± 10	49 ± 17	40 ± 15	54 ± 16	59 ± 12	58 ± 11	<0.0001
M/F (%)	36/64	53/47	58/42	36/64	61/39	53/47	
Smoking (%)	29	13	16	9	13	7	0.71
BMI (kg/m ²) ^a	25.5 ± 3.5	26.8 ± 4.4	25.8 ± 4.2	26.9 ± 4.4	28.7 ± 4.8	27.6 ± 3.9	0.02
Hypertension (%)	0	73	58	81	87	100	0.0003
History of CVD (%)	0	19	3	24	42	40	<0.0001
DM (%)	0	14	1	21	29	27	0.0004
MDRD (mL/min) ^a	71 ± 11	55 ± 33	86 ± 22	44 ± 9.2	21.5 ± 3.6	11.8 ± 1.9	<0.0001
Proteinuria (g/24h) ^a	0.0022 ± 0.0004	3.30 ± 5.20	2.60 ± 3.20	3.00 ± 4.00	5.70 ± 9.30	2.9 ± 3.0	0.04
Creatinine (mg/dL) ^a	0.97 ± 0.14	1.80 ± 1.24	0.96 ± 0.21	1.75 ± 0.30	2.89 ± 0.72	4.84 ± 0.98	<0.0001
Albumin (g/L) ^a	43.7 ± 2.4	31.9 ± 8.0	32.3 ± 8.8	31.8 ± 8.0	31.0 ± 7.6	31.8 ± 5.4	0.9
Prealbumin (g/L) ^a	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.08	0.26 ± 0.07	0.26 ± 0.08	0.29 ± 0.10	0.29 ± 0.08	0.13
CRP (mg/L) ^a	3.3 ± 2.0	6.4 ± 7.9	4.8 ± 4.7	7.0 ± 11.0	7.6 ± 7.2	7.9 ± 9.3	0.12
Orosomucoid (g/L) ^a	0.78 ± 0.19	1.10 ± 0.50	0.91 ± 0.43	1.25 ± 0.56	1.24 ± 0.44	1.33 ± 0.44	<0.0001
Cholesterol (mmol/L) ^a	5.43 ± 0.85	5.9 ± 2.2	6.0 ± 2.1	5.9 ± 2.2	5.8 ± 2.2	5.0 ± 2.3	0.48
Fibrinogen (g/L) ^a	3.3 ± 0.5	4.3 ± 1.0	4.3 ± 0.9	4.3 ± 1.3	4.5 ± 0.97	4.52 ± 0.82	0.70
Hemoglobin (g/dL) ^a	14.1 ± 1.0	11.8 ± 2.0	13.1 ± 1.7	11.3 ± 1.9	10.3 ± 1.3	10.1 ± 0.9	<0.0001
AGEs (AU) ^a	3.2 ± 0.48 × 10 ⁵	3.9 ± 1.7 × 10 ⁵	3.0 ± 1.0 × 10 ⁵	3.7 ± 1.4 × 10 ⁵	5.3 ± 1.9 × 10 ⁵	6.0 ± 1.7 × 10 ⁵	<0.0001

Notes: AGEs, advanced glycation end products; ANOVA, analysis of variance; AU, arbitrary units; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; CKD, chronic kidney disease; CVD, cardiovascular disease; DM, diabetes mellitus; F, female; M, male; MDRD, Modification of Diet in Renal Disease; SD, standard deviation. Reference ranges are creatinine, 0.50–1.24 mg/dL; albumin, 35–53 g/L; prealbumin, 0.20–0.40 g/L; CRP, <7 mg/L; orosomucoid, 0.50–1.20 g/L; cholesterol, 3.83–5.80 mmol/L; fibrinogen, 2–4 g/L; hemoglobin, 13.5–17.4 g/dL.

^aData are expressed as mean ± SD.

peripheral ischemic disease, and/or cerebrovascular disease. Most patients received medications commonly used in patients with CKD, such as diuretics, antiplatelet drugs, calcium and vitamin D supplements, statins, and antihypertensive drugs.

Methods

Blood samples

Fasting blood samples from each patient were collected through puncture of the cubital vein simultaneously with blood collection for routine examination. All blood samples were centrifuged for 10 min at 1,450 *g* (4°C). Sera were stored at -80°C until analysis.

Biochemical analysis

Determination of fluorescent AGE is based on spectrofluorometric detection according to Henle et al.¹² and Munch et al.¹³ Blood serum was diluted 1:50 with phosphate-buffered saline, pH 7.4, and fluorescence intensity was recorded at the emission maximum (≈440 nm) upon excitation at 350 nm (Fluoromax-3 spectrofluorometer, Jobin Yvon Horiba, Edison, New Jersey, USA). Fluorescence intensity was expressed in arbitrary units as AU.

C-reactive protein (CRP) was determined turbidimetrically, orosomucoid (acidic α_1 -glycoprotein) was assessed nephelometrically, and fibrinogen was measured by the thrombin method (Clauss).

Routine biochemical parameters were assessed using standard laboratory methods. Blood count was measured with an automated hematological analyzer. The eGFR was calculated using the MDRD formula.¹⁴

Statistics

Statistical analyses were performed using Statistics Toolbox™ MATLAB® software (The MathWorks™, Inc., Natick, Massachusetts, USA). Data are presented as the mean $\pm$ SD for continuous variables and percentages

for categorical variables. Comparisons between groups were conducted with unpaired sample *t*-tests and analysis of variance (ANOVA) for normally distributed continuous variables and Mann-Whitney *U* test and Kruskal-Wallis ANOVA for non-normal distributions. Variables with non-normal distributions were log-transformed where appropriate. Association among analyzed parameters was assessed using Spearman's or Pearson's correlation coefficient. All results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Table 1 illustrates the clinical, demographic, and laboratory data of the study group and controls. There was a trend to higher BMI for CKD 4 and CKD 5 compared with the controls ($p = 0.02$).

Mean serum AGE concentrations at different stages of CKD were $3.9 \pm 1.7 \times 10^5$ AU. Serum AGE levels were increased from CKD 3 ($3.7 \pm 1.4 \times 10^5$ AU, $p < 0.0001$) as well as there was an increase in orosomucoid levels (1.25 ± 0.56 g/L, $p < 0.0001$).

Moreover, patients with different stages of CKD with CVD, compared with those patients without CVD, had comparable AGE levels. Similarly, in patients with different stages of CKD with DM, there was no difference of AGE levels compared with those in patients without DM.

Parameters statistically and significantly related to AGE levels were age ($r = 0.206$, $p = 0.009$), albumin ($r = 0.178$, $p = 0.025$) (Figure 1), prealbumin ($r = 0.45$, $p = 0.0001$) (Figure 2), and orosomucoid ($r = 0.269$, $p = 0.001$) and those inversely related are eGFR ($r = -0.517$, $p = 0.0001$) and hemoglobin ($r = -0.36$, $p = 0.0001$) (Figure 3).

Multiple regression analysis was applied to evaluate the major factors that affect AGE levels in this study population. Finally, albumin ($p = 0.0006$), prealbumin

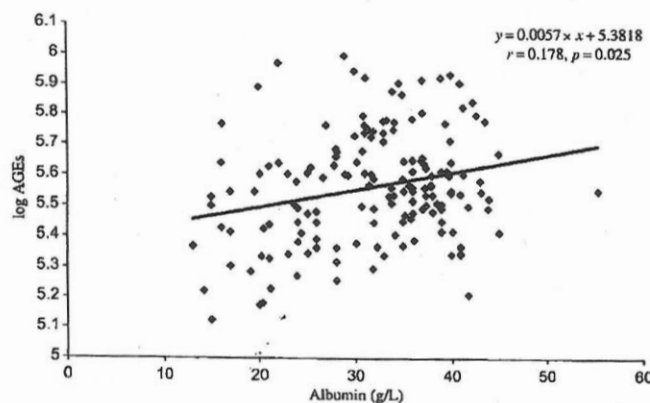


Figure 1. Correlation of log AGEs and albumin in CKD patients (1–5).

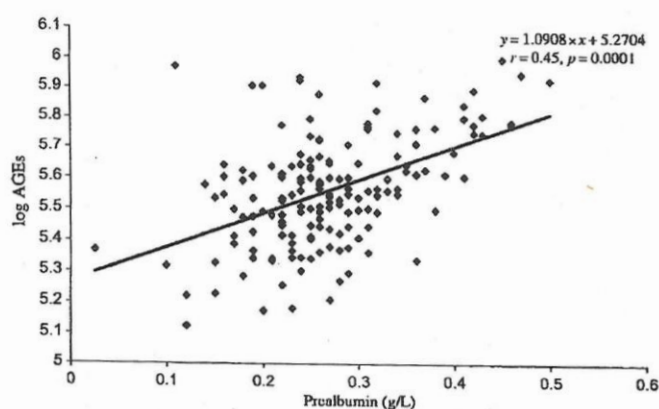


Figure 2. Correlation of log AGEs and prealbumin in CKD patients (1-5).

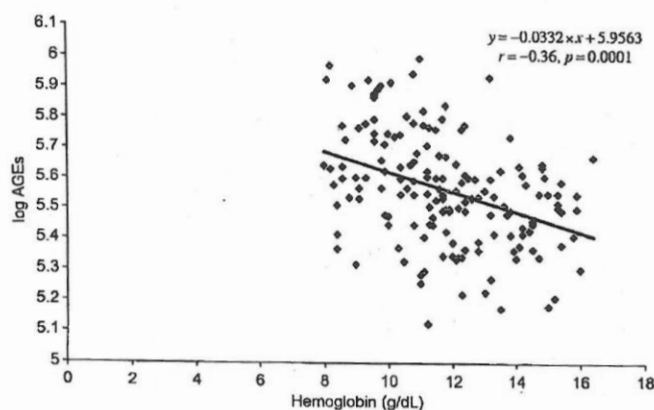


Figure 3. Correlation of log AGEs and hemoglobin in CKD patients (1-5).

Table 2. Factors associated with AGEs. Multivariate regression analysis using serum AGEs as the dependent variable (adjusted to age and eGFR).

Independent variables	B coefficient	SE	T	p-Value	Intercept	R ²
Albumin	0.0049	0.0014	3.49	0.0006	5.6	0.45
Prealbumin	1.016	0.141	7.19	<0.0001		
Hemoglobin	-0.0039	0.00053	-7.53	<0.0001		

Note: B, beta coefficient; SE, standard error; T, test statistic; R², coefficient of determination.

($p < 0.0001$), and hemoglobin (inversely $p < 0.0001$) even after adjustment for age and eGFR remained significant (Table 2) and were independently related to AGE levels ($R^2 = 0.45$).

Taken together, increased levels of AGEs are associated with nutrition markers, albumin and prealbumin, and lower hemoglobin in CKD 1-5 patients of various nephropathies not yet undergoing dialysis.

DISCUSSION

The most important finding in this study is the demonstration of the link between nutrition markers, anemia, and fluorescent AGE levels in CKD 1–5 patients of various nephropathies not yet undergoing dialysis. AGE levels were positively associated with albumin and prealbumin and negatively with hemoglobin, important risk markers for malnutrition, inflammation, atherosclerosis, and anemia.^{2,15–17}

We focused our analysis to subjects with various nephropathies not yet dialyzed for the following reasons. First, renal disorders linked with AGEs are reported not only during diabetic nephropathy but also during chronic renal failure, chronic inflammatory disease, high dietary AGE, and aging.^{18–23} Second, among 159 subjects enrolled in this study, only 14% patients had diabetes. Third, there is a possibility of association between AGE levels, markers of nutrition, and anemia if they are analyzed all together. Finally, AGEs are known to be important in atherosclerosis progression and are positively correlated with cardiovascular mortality in nondiabetic women.²⁴

There have been several studies reporting serum AGE levels in uremic patients. Some authors report no difference in the serum AGE levels in the patients with and without DM on chronic dialysis treatment.^{13,25} On the contrary, other authors^{26–28} described higher AGE levels in dialyzed patients with DM. Additionally, AGE levels in uremic patients were found to be several times higher than in patients with diabetes and normal kidney function. Mechanisms other than hyperglycemia therefore must be involved.²⁹ In this study, the AGE levels in CKD patients with DM and in those patients without DM were not different. The interpretation is difficult because the studied group of patients with DM was not large. Nevertheless, this finding suggests that the decreased AGE disposal in CKD patients is more essential for accumulation of AGEs than long-term glycemia in those CKD patients with DM.

In our study, AGE levels were inversely related to eGFR. The increase in AGE levels was evident from CKD 3. In CKD patients, the reason for the increase in AGEs is a decreased ability of the kidney to clear AGEs from circulation²³ and also increased carbonyl stress, a major pathogenic mechanism of AGE formation and risk factor for patients with CKD.³⁰

In hemodialysis patients, there is a controversy whether high AGE levels or other confounders including better nutritional status and a lower incidence of preexisting vascular disease influence better survival of hemodialysis patients.^{31,32} Our study showed no difference in AGE levels of CKD patients not yet dialyzed with CVD and those without CVD, but a relationship to nutritional status as in hemodialysis patients was found also in CKD patients not yet dialyzed. Similarly as in hemodialysis patients, it needs to be elucidated whether the benefit of high-serum AGEs is an epiphenomenon or reflects a better nutritional status also in CKD patients.

BMIs for CKD 4 and CKD 5 were significantly higher, implying that the subjects in these groups were overweight. Obesity is a known high-risk factor for the development of vascular diseases and CKD. Also, increased expression of proinflammatory cytokines and increased infiltration of immunocompetent cells were found in the obese patients with CKD stages 3–4.³³ It remains to be determined how important a rising BMI is in the association of AGEs with nutrition markers in the progressive stages of CKD.

Very limited data are present in patients with CKD not yet undergoing renal replacement therapy. In this study, in patients with CKD not yet dialyzed, we found a positive relationship of AGEs and age, albumin, prealbumin, and orosomucoid, whereas a negative relationship between AGEs and eGFR and hemoglobin was noted. This finding implies that a complex interplay between renal function, nutrition parameters, inflammation, and AGE levels exists in patients with various types of nephropathy. Indeed, circulating AGEs are linked to plasma proteins, mainly albumin,²⁹ and AGE accumulation in plasma proteins could be attributed to a gradual decrease in renal clearance of protein-linked AGEs. In this study, serum AGE levels were not correlated with proteinuria, but the increased levels of AGEs might implicate detrimental effects on the kidney inducing an increase in proteinuria in patients with CKD.

Individuals with CKD become progressively malnourished, as evidenced by low levels of albumin, prealbumin, and transferrin, which has been suggested to be a mechanism for activation of inflammation.³⁴ Malnutrition and chronic inflammation often coexist in CKD patients not yet on maintenance dialysis.³⁴ CRP and orosomucoid were shown to be the inflammatory markers in different stages of CKD.³⁵ AGEs might describe long-lasting oxidative damage.³⁶ Although there was no relation between AGE levels and CRP in a cohort of our patients, probably due to the high interindividual variability, a relationship between AGE levels and orosomucoid was found. A simultaneous increase of AGE levels and orosomucoid with decrease of renal function was shown. Thus the impact of micro inflammation and oxidative stress on AGE levels cannot be excluded in CKD patients not yet dialyzed.

In accordance with the study of Thomas et al.,³⁷ we also found a close association between declining hemoglobin and AGEs. It is not clear how hemoglobin levels influence either the production or the clearance of AGEs, but both hemoglobin and AGEs are markers of kidney injury. Certainly, anemia in CKD identifies patients at increased risk for progressive renal disease, hospitalization, and premature death.^{38,39} Reduced tissue oxygenation associated with anemia may contribute to the formation of AGEs. Given the continuous relationship between hemoglobin and renal function, this association deserves further studies.

In our multiple regression model, albumin, prealbumin, and negatively hemoglobin, after the adjustment for

age and eGFR, are independent determinants of fluorescent AGEs, supporting the notion that both low hemoglobin and nutrition parameters determine their levels in CKD patients. It is conceivable that AGEs might contribute to some of the risk for nutrition abnormalities and anemia associated with renal impairment.

Our study was limited by its observational nature, which allowed us to establish associations, but not causality. This study involved patients with various nephropathies with comorbidities, and the findings cannot necessarily be extrapolated to less morbid subjects. Dietary intake of AGEs was not assessed in this study. Angiotensin-converting enzyme-1 inhibitors are also another factor that may potentially modulate the AGE-RAGE pathway.⁴⁰

In conclusion, increased levels of AGEs are associated with nutrition markers, albumin and prealbumin, and lower hemoglobin and appear, at least, to partly modulate the development of malnutrition and anemia in CKD patients. Additional studies are needed to determine whether increased AGEs predict a development of malnutrition, inflammation, and atherosclerosis syndrome in patients with CKD.

Acknowledgments

This study was supported by research project MSM 0021620807. The authors are thankful to the laboratory staff for their technical assistance.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- [1] Siems W, Quast S, Carluccio F, et al. Oxidative stress in chronic renal failure as a cardiovascular risk factor. *Clin Nephrol*. 2002;58(Suppl. 1):S12-S19.
- [2] Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulter F, et al. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int*. 1999;55:1899-1911.
- [3] Brownlee M. Advanced glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med*. 1995;46:223-234.
- [4] Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation end product, Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem*. 1996;271:9982-9986.
- [5] Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: Implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res*. 2004;63:582-592.
- [6] Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289:F645-F659.
- [7] Daroux M, Prévost G, Maillard-Lefebvre H, et al. Advanced glycation end-products: Implications for diabetic and non-diabetic nephropathies. *Diabetes Metab*. 2010;36:1-10.
- [8] Hartog JW, Smit AJ, van Son WJ, et al. Advanced glycation end products in kidney transplant patients: A putative role in the development of chronic renal transplant dysfunction. *Am J Kidney Dis*. 2004;43:966-975.
- [9] Berrou J, Tostivint I, Verrecchia F, et al. Advanced glycation end products regulate extracellular matrix protein and protease expression by human glomerular mesangial cells. *Int J Mol Med*. 2009;23:513-520.
- [10] Halliwell B. The role of oxygen radicals in human disease with particular reference to vascular system. *Hemostasis*. 1993;23(Suppl. 1):118-126.
- [11] Boosalis MG, Snowden DA, Tully CL, Gross MD. Acute phase response and plasma carotenoid concentrations in older women: Findings from the nun study. *Nutrition*. 1996 Jul-Aug;12(7-8):475-478.
- [12] Henle T, Deppisch R, Beck W, Hergesell O, Hänsch GM, Ritz E. Advanced glycated end-products (AGE) during hemodialysis treatment: Discrepant results with different methodologies reflecting the heterogeneity of AGE compounds. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14:1968-1975.
- [13] Münch G, Keis R, Wessels A, et al. Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1997;35:669-677.
- [14] Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med*. 1999;130:461-470.
- [15] Riella MC. Malnutrition in dialysis: Malnourishment or uremic inflammatory response? *Kidney Int*. 2000;57:1211-1232.
- [16] Caravaca F, Arrobas M, Pizarro JL, Sanchez-Casado E. Uraemic symptoms, nutritional status and renal function in pre-dialysis end-stage renal failure patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16:776-782.
- [17] Jansen MA, Korevaar JC, Dekker FW, et al. Renal function and nutritional status at the start of chronic dialysis treatment. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:157-163.
- [18] Wautier JL, Schmidt AM. Protein glycation: A firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res*. 2004;95:233-238.
- [19] Horie K, Miyata T, Maeda K, et al. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest*. 1997;100:2995-3004.
- [20] Yamada K, Miyahara Y, Hamaguchi K, et al. Immunohistochemical study of human advanced glycosylation end-products (AGE) in chronic renal failure. Immunohistochemical study of human advanced glycosylation end-products (AGE) in chronic renal failure. *Clin Nephrol*. 1994;42:354-361.
- [21] Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:11704-11708.
- [22] Gugliucci A, Bendayan M. Reaction of advanced glycation endproducts with renal tissue from normal and streptozotocin-induced diabetic rats: An ultrastructural study using colloidal gold cytochemistry. *J Histochem Cytochem*. 1995;43:591-600.
- [23] Semba RD, Ferrucci L, Fink JC, et al. Advanced glycation end products and their circulating receptors and level of kidney function in older community-dwelling women. *Am J Kidney Dis*. 2009;53:51-58.
- [24] Kilhovd BK, Juutilainen A, Lehto S, et al. High serum levels of advanced glycation end products predict increased coronary heart disease mortality in nondiabetic women but not in nondiabetic men: A population-based 18-year follow-up study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:815-820.
- [25] Papanastasiou P, Grass L, Rodela H, Parikarea A, Oreopoulos D, Diamandis EP. Immunological quantification of advanced

- glycosylation end-products in the serum of patients on hemodialysis or CAPD. *Kidney Int.* 1994;46:216-222.
- [26] Makita Z, Bucala R, Rayfield BJ, et al. Reactive glycosylation endproducts in diabetic uraemia and treatment of renal failure. *Lancet.* 1994;343:1519-1522.
- [27] Vlassara H. Serum advanced glycosylation end products: A new class of uremic toxins? *Blood Purif.* 1994;12:54-59.
- [28] Kalousova M, Zima T, Tesaf V, et al. Glycooxidation in hemodialyzed patients with diabetes mellitus. In: Timio M, Wiemann V, Venanzi, eds. *Cardionephrology*. Vol. 7. Cosenza, Italy: Editoriale Bios; 2002:297-300.
- [29] Miyata T, Fu MX, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Thorpe SR, Baynes JW. Autooxidation products of both carbohydrates and lipids are increased in uremic plasma: Is there oxidative stress in uremia? *Kidney Int.* 1998;54:1290-1295.
- [30] Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K, Baynes JW. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: Origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int.* 1999;55:389-399.
- [31] Schwedler SB, Metzger T, Schinzel R, Wanner C. Advanced glycation end products and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2002;62:301-310.
- [32] Wagner Z, Molnár M, Molnár GA, et al. Serum carboxymethyllysine predicts mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2006;47:294-300.
- [33] Teplan V, Vyhnanek F, Gürtlich R, et al. Increased proinflammatory cytokine production in adipose tissue of obese patients with chronic kidney disease. *Wien Klin Wochenschr.* 2010; 122(15-16):466-473.
- [34] Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergström J. Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:953-960.
- [35] Romão JE Jr, Hailashi AR, Elias RM, et al. Positive acute-phase inflammatory markers in different stages of chronic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2006;26:59-66.
- [36] Kalousova M, Sulková S, Fialová L, et al. Glycooxidation and inflammation in chronic hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18:2577-2581.
- [37] Thomas MC, Tsalamandris C, MacIsaac R, et al. Low-molecular-weight AGEs are associated with GFR and anemia in patients with type 2 diabetes. *Kidney Int.* 2004;66:1167-1172.
- [38] Holland DC, Lam M. Predictors of hospitalization and death among pre-dialysis patients: A retrospective cohort study. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:650-658.
- [39] McClellan WM, Flanders WD, Langston RD, Jurkovic C, Presley R. Anemia and renal insufficiency are independent risk factors for death among patients with congestive heart failure admitted to community hospitals: A population-based study. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:1928-1936.
- [40] Forbes JM, Thorpe SR, Thallas-Bonke V, et al. Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibition in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:2363-2372.

al (Active) on 03/16/11

Rem Fail Downloaded from informahealthcare.com by
For personal use only.