

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI
ÚSTAV KLINICKÉ BIOCHEMIE A HEMATOLOGIE

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Metabolické účinky suplementace L-karnitinem
u hemodialyzovaných nemocných

Plzeň 2007

MUDr. Roman Cibulka

**Dizertační práce prezenční formy doktorského studijního programu
v oboru lékařská biochemie a patobiochemie**

**Téma: Metabolické účinky suplementace L-karnitinem
u hemodialyzovaných nemocných**

Autor: MUDr. Roman Cibulka

Školitel: prof. MUDr. Jaroslav Racek, DrSc.

Pracoviště: Ústav klinické biochemie a hematologie LF UK a FN v Plzni,

Alej Svobody 80, 304 60, Plzeň

Obsah

Abecední seznam zkratk užitých v textu	5
1. Úvod	8
2. Metabolické změny u nemocných v terminální fázi onemocnění ledvin	10
2.1. Acidobazická rovnováha	10
2.2. Ukazatele nutriční a chronické zánětu	11
2.2.1. Metabolismus proteinů	11
2.2.2. Metabolismus sacharidů	11
2.2.3. Metabolismus lipidů	12
2.3. Renální anémie	13
2.4. Renální osteodystrofie	14
2.5. Kardiovaskulární onemocnění	15
2.6. Oxidační stres	16
2.7. Amyloidóza	17
2.8. Hyperhomocysteinémie a endotelová dysfunkce	17
3. L-karnitin a jeho význam pro organismus	18
3.1. Chemické vlastnosti a účinky L-karnitinu	18
3.2. Metabolismus L-karnitinu	21
3.3. Deficit L-karnitinu	23
3.4. Deficit L-karnitinu u hemodialyzovaných nemocných a význam jeho suplementace	25
4. Cíl studie	29
5. Soubor nemocných	30
6. Design studie	31
7. Metody stanovení	34
7.1. Stanovení L-karnitinu	34
7.2. Ostatní metody stanovení	37
7.2.1. Stanovení červeného krevního obrazu	38
7.2.2. Stanovení parametrů lipidového metabolismu	38
7.2.3. Stanovení ukazatelů nutriční a zánětu	38
7.2.4. Stanovení ukazatelů oxidačního stresu a antioxidační ochrany	38
7.2.5. Stanovení ukazatelů kalciofosfátového a kostního metabolismu	39

8. Výsledky	39
8.1. Změny koncentrace L-karnitinu	39
8.2. Změny červeného krevního obrazu a dávek erythropoetinu	42
8.3. Změny metabolismu lipidů	42
8.4. Změny ukazatelů nutrice a zánětu	44
8.5. Ovlivnění oxidačního stresu a antioxidační ochrany	45
8.6. Vliv na kalciofosfátový a kostní metabolismus	48
8.7. Změny klinického stavu	51
9. Diskuze	51
10. Závěry a doporučení	55
Zdroje podpory	57
Anotace	58
Literatura	62
Příloha č. 1 – seznam publikovaných prací, přednášek a posterových sdělení	71
Příloha č. 2 – účast na grantových projektech a klinických studiích	77
Příloha č. 3 – potvrzení o přijetí článku k publikaci	78
Souhlas se zapůjčováním dizertační práce	80

Abecední seznam zkratk užitých v textu

acetyl-CoA – acetylkoenzym A

acetyl-KAR – acetylkarnitin

ACP – kyselá fosfatáza

acyl-CoA – acylkoenzym A

acyl-KAR – acylkarnitin

ADMA – asymetrický dimethylarginin

AGE látky – advanced glycation end-products

ALP – alkalická fosfatáza

AOPP – advanced oxidation protein products

ATP – adenosintrifosfát

b-ALP – kostní izoenzym ALP

γ -BB – γ -butyrobetain

BMI – body mass index

CACT – karnitinacylkarnintranslokáza

CAT – karnitinacetyltransferáza

CoA – koenzym A

CPT – karnitinpalmitoyltransferáza

CRP – C-reaktivní protein

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DRCD – dialysis-related carnitine disorder

eNOS – endoteliální NO syntáza

EPO – erytropoetin

GF – glomerulární filtrace

GPx – glutathionperoxidáza

GSH – redukovaný glutathion

Hb – hemoglobin

Hcy – homocystein

HDL – lipoproteiny o vysoké hustotě

HTML – β -hydroxytrimethyllysin

IF – impact factor

K₃EDTA – draselná sůl kyseliny etylediaminotetraoctové

KAR – L-karnitin

LDL – lipoproteiny o nízké hustotě

Lp(a) – lipoprotein (a)

MDA – malondialdehyd

MICS – malnutrition-inflammation complex syndrome

MK – mastné kyseliny

NADH – nikotinamidadenindinukleotid

NO – oxid dusnatý

OC – osteokalcin

OCTN2 – organic cation/carnitine transporter

OPG – osteoprotegerin

oxLDL – oxidované LDL částice

PTH – parathormon

RANK – receptor activator of nuclear factor NF- κ B

RANKL – receptor activator of nuclear factor NF- κ B-ligand

rHuEPO – rekombinantní lidský erytropoetin

SOD – superoxiddismutáza

TAG – triacylglyceroly

TBARS – thiobarbituric acid-reactive substances

TMABA – γ -trimethylaminobutyraldehyd

TML – ϵ -N-trimethyllysin

VLDL – lipoproteiny o velmi nízké hustotě

VR – volné radikály

1. Úvod

Vzhledem k demografickému vývoji populace je problematika chronických renálních onemocnění spojených s náhradou funkce ledvin velice aktuální. Se stále se zvyšujícím počtem osob vysokého věku došlo za posledních 30 let k rapidnímu nárůstu počtu léčených pacientů. V počátcích rozvoje hemodialyzační léčby, v 60. až 70. letech minulého století, byly pokročilý věk a přidružené nemoci považovány za kontraindikace zařazení do dialyzačního programu. Důvodem byl nedostatek dialyzačních kapacit a nedokonalá dialyzační technologie. Technický pokrok a finanční zajištění umožnily, že od 80. let se v zemích s rozvinutou ekonomikou pravidelné dialyzační léčení s možností transplantace ledvin stalo rutinní a dostupnou metodou pro všechny pacienty, kteří dospěli do stadia nezvratného renálního selhání. Následně se počet léčených prudce zvýšil a zvyšuje se dosud. Například v USA v současné době postihuje chronické onemocnění ledvin okolo 19 milionů dospělých pacientů a jeho incidence se neustále zvyšuje [Snyder & Pendergraph, 2005]. Tento trend je způsoben jak technickým pokrokem a vyšší dostupností dialyzační terapie, tak snižující se mortalitou na přidružená onemocnění, zejména kardiovaskulární. Významným faktorem je také rostoucí počet diabetiků v populaci, kteří dnes představují více než 35 % pacientů na dialýze [Cibulka *et al.*, 2005].

Chronické renální onemocnění je charakterizováno postupným zhoršováním ledvinných funkcí a může dospět až do terminální fáze renálního selhání. V posledních letech došlo ke změně v klasifikaci chronického renálního selhání do 5 stádií podle hodnoty glomerulární filtrace (GF) [Levey *et al.*, 2005]. V pátém stádiu (GF < 15 ml/min, tj. < 0,25 ml/s) již ledviny nejsou schopny udržet s životem slučitelné složení vnitřního prostředí ani za bazálních podmínek, speciálních dietních a medikamentózních opatření a ve vyrovnané metabolické situaci organismu. K prodloužení života nemocného je nutné použití metod nahrazujících funkci ledvin. Bez použití těchto metod se vyvíjí soubor klinických příznaků,

který označujeme jako uremický syndrom (nauzea, zvracení, krvavé průjmy, polyneuropatie, kóma, perikarditida aj.). Mezi techniky nahrazující funkci ledvin patří peritoneální dialýza, hemodialýza a jiné extrakorporální očišťovací procedury a transplantace ledvin. Existence dialyzačních technik umožňuje na jedné straně dlouhodobé přežití nemocných, na druhé straně však vede k rozvoji některých metabolických poruch, které se dříve pro úmrtí pacienta nestačily manifestovat [Cibulka & Racek, 2007]. Patogeneze těchto metabolických poruch je velmi složitá, ale v principu v sobě zahrnuje procesy kumulace, deficitu a poruchy regulace jednotlivých metabolických dějů.

V procesu kumulace hrají významnou úlohu poruchy vylučovací funkce ledvin, které se projevují retencí metabolitů (kreatinin, urea, elektrolyty, voda aj.). Uplatňuje se i nadměrná tvorba metabolitů při katabolických procesech nebo alternativní cesty metabolismu. Následky kumulace částečně pozitivně ovlivňuje dialýza nebo jiné očišťovací metody.

Deficit substrátů v organismu je dán jednak nedostatečným příjmem v potravě či poruchou absorpce, jednak jejich zvýšenou ztrátou. V některých případech dochází k těmto zvýšeným ztrátám při dialýze přes hemodialyzační membránu. Velmi významnou roli zde hraje porušená syntéza důležitých metabolických regulátorů (erythropoetin, aktivní vitamin D aj.).

Následky hromadění některých látek a deficit tvorby jiných se může pak projevit v poruchách regulace a v stimulaci alternativních cest metabolismu [Cibulka & Racek, 2007; Cibulka *et al.*, 2005].

Výše uvedené faktory vedou k řadě komplikací u nemocných jak v predialyzačním období, tak při dialyzačním léčení. Pravidelná dialyzační léčba sice vede k snížení kumulace látek, ale nezabrání deficitu. Naopak jej v některých případech ještě zvýší ztrátami při dialýze. Populace dialyzovaných nemocných patří také proto k velmi rizikové skupině osob. Tito nemocní jsou ohroženi například předčasným a rychlým rozvojem aterosklerózy včetně jejích

závažných komplikací, poruchami nutriční, chronickým zánětlivým stavem, oxidačním stresem, vznikem sekundární a eventuálně i terciální hyperparathyreózy, anémií a jinými závažnými chorobami, které zhoršují jejich prognózu a kvalitu života [Cibulka & Racek, 2007; Durak *et al.*, 1994; Lindner *et al.*, 1974; Silver, 2000].

2. Metabolické změny u nemocných v terminální fázi onemocnění ledvin

2.1. Acidobazická rovnováha

U nemocných v pokročilejších stádiích ledvinných chorob se často setkáváme s poruchami acidobazické rovnováhy. Metabolická acidóza se vyskytuje u většiny pacientů, u nichž poklesne GF pod 25 % normálu. Stupeň acidózy koreluje se závažností renálního postižení a zvyšuje se s poklesem GF [Kraut & Kurtz, 2005]. U mírnější chronické renální insuficience bývá metabolická acidóza zejména důsledkem snížené schopnosti ledvinných tubulů reabsorbovat hydrogenuhličitan a vylučovat amonné ionty. Vzniká hyperchloremická acidóza s normální nebo jen mírně zvýšenou hodnotou anion gap. V pokročilejších stádiích renálního selhání dochází k hromadění kyselých metabolitů, které postižené ledviny již nejsou schopny v dostatečné míře vylučovat (jedná se zejména o fosfáty a sulfáty), a vzniká metabolická acidóza se zvýšenou hodnotou anion gap [Kovacic *et al.*, 2003]. Acidóza v terminální fázi onemocnění ledvin se označuje jako uremická [Oh *et al.*, 2004].

Mezi klinické následky uremické acidózy patří hlavně negativní dusíková bilance, renální kostní choroba, nechutenství, únava, hormonální abnormality, snížená citlivost k inzulínu, hyperkalémie, zhoršená glukoneogeneze, poruchy tukového metabolismu aj. [Kovacic *et al.*, 2003; Kraut & Kurtz, 2005].

2.2. Ukazatele nutriční a chronického zánětu

2.2.1. Metabolismus proteinů

K poruše metabolismu proteinů u renálních onemocnění dochází téměř vždy, klesne-li funkce ledvin k velmi nízkým hodnotám. V predialyzačním období může hrát roli nevhodně sestavená nízkoproteinová dieta. Bezpečná nízkoproteinová dieta (0,6 g/kg/den) by neměla vést k negativní dusíkové bilanci organismu. Častěji jsou změny v metabolismu bílkovin způsobeny kombinovanou (proteino-energetickou) malnutricí v důsledku nechutenství (uremická malnutrice). Ta je charakterizována pozvolnou ztrátou svalové hmoty, poklesem sérové koncentrace kreatininu, albuminu a prealbuminu. Je přítomna přibližně u 20 až 50 % dialyzovaných pacientů [Ikizler, 2004]. Na její vznik mají vliv také případné ztráty bílkovin močí, ztráty aminokyselin při hemodialýze a metabolická acidóza [Kovacic *et al.*, 2003; Mehrotra *et al.*, 2003]. Bylo prokázáno, že uremická malnutrice zvyšuje mortalitu a morbiditu hemodialyzovaných nemocných [Ikizler *et al.*, 1999; Kopple, 1994], a že je velmi často kombinována s chronickým zánětlivým stavem (*malnutrition-inflammation complex syndrome* – MICS) [Kalantar-Zadeh *et al.*, 2003].

2.2.2. Metabolismus sacharidů

Nemocní v chronické renální insuficienci často trpí poruchou metabolismu sacharidů se sklonem k hyperglykémii a hyperinzulinismu na základě periferní inzulínové rezistence. Diabetici představují více než 35 % pacientů na dialýze [Cibulka *et al.*, 2005], nicméně nediabetičtí dialyzovaní nemocní mají také často porušenou glukózovou toleranci [Alvestrand, 1997]. Příčina není zcela jasná, může se jednat o snížení aktivity glykolytických enzymů v důsledku hromadění různých uremických toxinů (hippurát, acylové zbytky), nedostatečné fyzické aktivity, přítomnosti metabolické acidózy, hyperparathyreózy či nedostatku vitamínu D [Cibulka *et al.*, 2005; Rasić-Milutinović *et al.*, 2000]. Inzulínová

rezistence může být nezávislý faktor způsobující hypertenzi [Ferrannini *et al.*, 1987] a přispívá k vysoké kardiovaskulární morbiditě a mortalitě nemocných s chronickým renálním selháním [Shinohara *et al.*, 2002; Shoji *et al.*, 2001]. Základní příčinou může být zhoršená syntéza oxidu dusnatého (NO) v endotelu těchto pacientů. Bylo prokázáno, že náležitě fungující endoteliální NO syntáza (eNOS) je důležitá nejen pro regulaci krevního tlaku, ale také sacharidového a lipidového metabolismu [Duplain *et al.*, 2001].

2.2.3. Metabolismus lipidů

Poruchy metabolismu sacharidů mají těsný vztah k poruchám metabolismu lipidů. U nemocných s chronickou renální insuficiencí nacházíme zejména zvýšenou hodnotu triacylglycerolů (TAG), lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL) a částečně i lipoproteinů o nízké hustotě (LDL). Naproti tomu hladiny lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL) bývají u těchto pacientů nižší. V patogenezi těchto poruch se pravděpodobně podílí jak zvýšená tvorba, tak porušené odbourávání některých lipidů. To se týká především TAG, kde jejich zvýšená hladina koresponduje s hyperinzulinémií nalačno. Předpokládá se zde vystupňovaná jaterní syntéza TAG stimulovaná inzulinem a zároveň porucha mitochondriální beta-oxidace mastných kyselin (MK) způsobená nedostatkem L-karnitinu (KAR), která se vyskytuje zejména u hemodialyzovaných nemocných [Ahmad *et al.*, 1990; Cibulka *et al.*, 2005; Guarnieri *et al.*, 1992]. Hladiny LDL mohou být sice normální, ale často se jedná o podtřídu vysokodenzních malých částic označovaných jako LDL₃, které mají největší aterogenní účinek. Hladiny HDL bývají jednak snižené, a navíc jsou HDL částice strukturálně modifikované následkem chronického zánětlivého stavu [Cibulka & Racek, 2007].

Některé studie popisují tzv. reverzní epidemiologii tradičních rizikových faktorů rozvoje aterosklerózy (včetně jednotlivých složek lipidového spektra) u nemocných s chronickým renálním selháním. Za tento fenomén je pravděpodobně zodpovědný rozvoj

MICS. Jelikož MICS způsobuje snížení body mass indexu (BMI), cholesterolemie, kreatininémie, homocysteinémie aj., mohou hypercholesterolemie, nadváha, vyšší sérové hladiny kreatininu či homocysteinu paradoxně vést k lepší prognóze nemocných s chronickým renálním selháním [Kalantar-Zadeh *et al.*, 2003; Kalantar-Zadeh *et al.*, 2005].

Lipoprotein (a), Lp(a), je lipoproteinová částice řadící se (podle hustoty a struktury) k lipoproteinům o nízké hustotě. Má však navíc typický apolipoprotein (a), který jeví vysoký stupeň homologie se strukturou pazminogenu. Pro svůj výrazný antifibrinolytický efekt a podporu proliferačních dějů v cévní stěně patří Lp(a) k důležitým nezávislým rizikovým faktorům rozvoje aterosklerózy. Nejvyšší hladiny Lp(a) byly nalezeny u nemocných s renálním selháním léčených hemodialýzou z důvodu zániku funkčního parenchymu ledvin, který se významně podílí na katabolismu Lp(a) [Kronenberg *et al.*, 1996].

2.3. Renální anémie

Anémie pacientů s chronickým selháním ledvin (renální anémie) má více příčin. Podílí se na ní zejména nedostatečná produkce erythropoetinu (EPO) v důsledku úbytku funkčního parenchymu ledvin, a dále pak hemolýza způsobená volnými radikály leukocytů vzniklých jejich stykem s dialyzační membránou [Eiselt *et al.*, 1999]. Mezi další faktory patří uremické toxiny, které mohou vést k hemolýze a tím ke sníženému přežívání erytrocytů o třetinu až polovinu. Někdy se uplatní na hloubce anémie také parathormon (PTH), proteinová malnutrice [Eschbach & Adamson, 1985] a deficit železa [Santoro, 2002].

Renální anémie je nezávislým rizikovým faktorem rozvoje srdečního selhání a prediktorem mortality u hemodialyzovaných pacientů [Golper *et al.*, 2003].

Při léčbě renální anémie se využívá zejména suplementace rekombinantním lidským EPO (rHuEPO), která je však u některých pacientů málo účinná. Nedostatečná citlivost k rHuEPO se spolupodílí na vzniku mnohých symptomů, které snižují kvalitu života

nemocných (nižší tolerance zátěže, zhoršení kognitivních funkcí, nechutenství, nespavost, deprese aj.). Tyto symptomy mohou být zejména u pacientů na dialýze částečně způsobeny také deficitem KAR (*dialysis-related carnitine disorder* – DRCD), který má negativní vliv na tvorbu a přežívání erytrocytů. Některé studie prokázaly příznivý účinek suplementace KAR na červený krevní obraz u hemodialyzovaných nemocných [Golper *et al.*, 2003].

Hepcidin je bílkovina, která jednak snižuje vstřebávání železa v duodenu, jednak brání uvolňování železa z makrofágů. Jeho syntéza a aktivita je indukována chronickým zánětlivým stavem, k jeho retenci dochází při snížení GF. Zvýšená koncentrace hepcidinu se taktéž spolupodílí na poruše vstřebávání a utilizace železa a tím na vzniku anémie špatně reagující na léčbu rHuEPO u pacientů na dialýze [Deicher & Hörl, 2004].

2.4. Renální osteodystrofie

Renální kostní choroba (renální osteodystrofie či osteopatie) je závažným problémem u pacientů s chronickým selháním ledvin. Jedná se o multifaktoriální poruchu kostní remodelace, která zahrnuje stavy s vysokým i nízkým kostním obratem. Stavy s vysokým kostním obratem (osteitis fibrosa) jsou následkem působení sekundární hyperparathyreózy na kostní tkáň. Stavy s nízkým kostním obratem, jejichž prevalence neustále narůstá, jsou reprezentovány zejména adynamickou kostní chorobou, méně často osteomalácií.

V klinickém obraze jde většinou o kombinaci vysokoobratové a nízkoobratové osteopatie, většinou však jeden z těchto stavů převažuje [González & Martin, 2001].

Základní příčinou renální osteodystrofie je porucha metabolismu vitamínu D, jejímž základem je nedostatečná hydroxylace 25-hydroxycholekalCIFerolu nemocnými ledvinami a která vede k deficitu kalcitriolu, zodpovědného za dostatečnou resorpci vápníku ve stěvě. Vzniklá hypokalcémie je ještě zhoršována retencí fosfátů, které snižují aktivitu 1-alfa-hydroxylázy, enzymu, který je zodpovědný za přeměnu 25-hydroxycholekalCIFerolu na 1,25-

dihydroxycholekalCIFerol (kalcitriol) neboli aktivní vitamin D3, a navíc vážou kalcium ve formě fosforečnanu vápenatého. Dlouhodobý pokles koncentrace ionizovaného vápníku spolu s retencí fosfátů působí stimulaci příštítných tělísek se vznikem sekundární hyperparathyreózy, což vede k částečné úpravě sérové hladiny vápníku, avšak za cenu odvápnění kostní tkáně. Tento proces je potencován chronickou metabolickou acidózou [Kraut & Kurtz, 2005].

Kromě vlivu fosfátů na rozvoj renální osteodystrofie byla hyperfosfatémie identifikována jako důležitý rizikový faktor mortality na kardiovaskulární choroby u nemocných s chronickým selháním ledvin, neboť zvyšuje riziko cévních kalcifikací [Giachelli *et al.*, 2005].

2.5. Kardiovaskulární onemocnění

Mezi nejzávažnější komplikace spojené s chronickým renálním selháním a dialyzační terapií patří bezesporu akcelerovaná ateroskleróza a s ní související častý výskyt kardiovaskulárních onemocnění. Kardiovaskulární mortalita pacientů v terminální fázi onemocnění ledvin je asi dvacetkrát vyšší než u osob srovnatelného věku s normální funkcí ledvin [Levey & Eknoyan, 1999]. Riziko úmrtí na kardiovaskulární chorobu se zvyšuje proporcionálně s poklesem GF. Signifikantně vyšší je již při poklesu GF pod 75 ml/min. (tj. 1,25 ml/s). Pacienti s normální GF a výskytem albuminurie mají rovněž zvýšené kardiovaskulární riziko [Go *et al.*, 2004].

Vyšetřování tradičních kardiovaskulárních rizikových faktorů (hypertenze, dyslipidémie, diabetes, kouření aj.) a jejich případné včasné léčebné ovlivnění zůstává zlatým standardem [Snyder & Pendergraph, 2005]. National Kidney Foundation doporučuje udržet krevní tlak u nemocných s normální koncentrací albuminu v moči na hodnotě maximálně 130/80 mmHg a 125/75 mmHg u nemocných s proteinurií větší než 1 g/24 hodin [National

Kidney Foundation, 2002]. Co se týká hladiny krevních lipidů, zde nejsou doporučení zcela jednoznačná. Jak již bylo uvedeno výše, podle závěrů některých studií mají nemocní s chronickým renálním onemocněním lepší prognózu spíše při vyšší cholesterolemii. Nízké hladiny cholesterolu u nich mohou totiž být známkou malnutrice a chronického zánětlivého stavu (MICS) [Kalantar-Zadeh *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2004]. Mezi další kardiovaskulární rizikové faktory specifické pro chronické renální selhání patří například objemové přetížení krevního oběhu, hyperparathyreóza, endotelová dysfunkce, oxidační stres aj.

2.6. Oxidační stres

Jedná se o stav, kdy dochází k dlouhodobé nadprodukci volných kyslíkových radikálů (VR), vysoce reaktivních látek s nepárovým elektronem v zevním orbitalu, které atakují lipidy, proteiny a nukleové kyseliny a mění strukturu a funkci těchto makromolekul [Eiselt *et al.*, 1999; Klaunig *et al.*, 1998]. Oxidační stres poškozují také LDL částice (vznikají tzv. modifikované LDL), které nejsou dobře rozpoznávány LDL-receptory na povrchu buněk a pronikají endotelem do cévní stěny. Podle současných teorií se jedná o základní patogenetický mechanismus vedoucí ke vzniku aterosklerotických lézí.

Oxidační stres ohrožuje hlavně pacienty na dialýze, a to vznikem závažných klinických komplikací (např. akcelerovanou aterosklerózou, hemolýzou, rozvojem chronického zánětu, amyloidózou aj.). VR se u nich tvoří převážně v leukocytech, aktivovaných stykem s nedostatečně biokompatibilní dialyzační membránou. Dalším zdrojem VR může být hemoglobin (Hb), resp. železo uvolněné z erytrocytů při hemolýze. Trvalá nadprodukce VR u dialyzovaných nemocných přispívá k fenoménu, označovanému jako stav chronického zánětu [Eiselt *et al.*, 1999].

2.7. Amyloidóza

Podstatou amyloidózy je ukládání bílkoviny amyloidu do mezibuněčného prostoru různých tkání. Tím dochází k poškození příslušného orgánu. Amyloidóza je častou komplikací dialyzovaných nemocných. Dochází u nich k ukládání β_2 -mikroglobulinu zejména do kostí a kloubů, což způsobuje například syndrom karpálního tunelu, artropatii nebo tvorbu subchondrálních cyst. Patogeneze není zcela objasněná, pravděpodobně se zde mimo jiné uplatňuje oxidační modifikace molekuly β_2 -mikroglobulinu [Miyata *et al.*, 1999].

2.8. Hyperhomocysteinémie a endotelová dysfunkce

Hyperhomocysteinémie je přítomna u většiny nemocných s chronickým selháním ledvin. Plazmatické hladiny homocysteinu (Hcy) u nich bývají 3 až 4 krát vyšší než jsou normální hodnoty [Suliman *et al.*, 2001]. Příčiny nejsou zcela jasné, může se jednat o porušený renální nebo extrarenální metabolismus Hcy v důsledku působení různých uremických toxinů [Perna *et al.*, 2004]. V obecné populaci je hyperhomocysteinémie považována za nezávislý rizikový faktor rozvoje kardiovaskulárních onemocnění. Jak již bylo zmíněno, v populaci nemocných s chronickým renálním selháním existuje reverzní epidemiologie tradičních kardiovaskulárních rizikových faktorů. To se týká také Hcy, takže pacienti se zvýšenou hladinou mají paradoxně lepší prognózu než pacienti s normální nebo sníženou hladinou. Nižší koncentrace Hcy může být totiž známkou malnutrice a chronického zánětlivého stavu (MICS) [Kalantar-Zadeh *et al.*, 2005; Suliman *et al.*, 2001].

Na druhé straně toxicitu Hcy nelze zpochybňovat. Hcy se podílí na strukturální modifikaci proteinů a deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Způsobuje poruchu methylace DNA, což může být příčinou cévního poškození [Perna *et al.*, 2005]. Dále je hyperhomocysteinémie jedním z hlavních kandidátů vzniku endotelové dysfunkce. Hcy může zhoršovat funkci endotelu zvýšenou tvorbou VR a sníženou produkcí NO. Normálně fungující

endotel je intaktní s přiměřeně fungující endoteliální eNOS, generující stálé množství NO [Nedeljkovic *et al.*, 2003]. Tento tkáňový hormon má výrazné vazodilatační, antiagregační, antiadhezní a antiproliferační účinky v cévní stěně. U nemocných s chronickým renálním selháním je výrazně narušena funkce eNOS, a v důsledku toho i produkce NO [Kone, 1997]. Přesná patogeneze je však stále předmětem diskuzí. Někteří autoři se domnívají, že příčinou porušené endoteliální funkce těchto nemocných je hromadění asymetrického dimethylargininu (ADMA), endogenního inhibitoru eNOS. Existuje úzké spojení mezi metabolismem Hcy a metabolismem ADMA. Hcy je produkován ve zvýšené míře během syntézy ADMA, a následně zhoršuje katabolismus ADMA (inhibicí enzymu dimethylarginin-dimethylaminohydrolázy) [Dayal & Lentz, 2005]. V některých studiích byla zvýšená hladina ADMA identifikována dokonce jako nezávislý prediktor mortality u pacientů s chronickým onemocněním ledvin [Ravani *et al.*, 2005].

3. L-karnitin a jeho význam pro organismus

3.1. Chemické vlastnosti a účinky L-karnitinu

KAR je dalším příkladem látky, jejíž metabolismus je významně ovlivněn chronickým renálním onemocněním a dialyzační terapií [Cibulka *et al.*, 2005].

KAR byl původně izolován ze zvířecího masa (název pochází z latinského slova *caro* = maso). Nejvíce je obsažen ve skopovém, jehněčím a hovězím mase. V rostlinné stravě prakticky zcela chybí. Chemicky se jedná o kyselinu 3-hydroxy-4-N-trimethylaminomáselnou (viz *Obr. 1.*), což je nízkomolekulární látka podobná aminokyselinám s tím rozdílem, že atom dusíku je umístěn na 4. atomu uhlíku (v molekulách aminokyselin je aminoskupina umístěna na 2. uhlíku). Atom dusíku poskytuje čtyři vazby, proto se jedná o tzv. kvarterní amin – atom dusíku má kladný náboj. V přírodě se vyskytuje pouze *L*-forma KAR, jen ta je biologicky účinná. *D*-forma je nejen neúčinná, ale působí dokonce toxicky, neboť kompetitivně inhibuje

transportní systémy pro *L*-formu KAR a může tak způsobit jeho nedostatek v buňkách [Cibulka, 2005].

Co se týká metabolických účinků KAR, první prokázanou úlohou byl přenos aktivovaných MK přes vnitřní mitochondriální membránu [Friedmann & Fraenkel, 1955], což má zásadní význam pro jednu z hlavních metabolických drah – beta-oxidaci MK, a pro energetický metabolismus buňky jako takový. Volné (neesterifikované) MK jsou uvolňované hydrolýzou tuků (TAG) z tukových depo nebo tuků potravy. Tyto MK jsou transportovány na místo dalšího zpracování krví, vlastním přenašečem je albumin. Po přestupu do buňky je molekula MK aktivována jednou molekulou adenosintrifosfátu (ATP) a získá tak energii pro vstup do metabolických pochodů (tzv. makroergní charakter). Tato aktivace probíhá v cytoplazmě, aktivační enzymy (thiokinázy) jsou součástí vnější mitochondriální membrány. Vzniká acyladenylát, který reaguje s univerzálním přenašečem aktivovaných zbytků kyselin, koenzymem A (CoA), za vzniku acyl-CoA. Ten však není schopen proniknout mitochondriální membránou, aby předal molekulu MK k beta-oxidaci, která probíhá uvnitř mitochondrií. Pro tento přenos aktivované MK je využit zvláštní přenašeč KAR, jenž uchovává makroergní charakter acylového zbytku a snadno proniká do mitochondrie. Uvedený proces je využíván pro MK s dlouhým řetězcem, z nichž tak vznikají deriváty KAR, tzv. acylkarnitiny (acyl-KAR – estery KAR). Aktivace nižších MK a jejich oxidace v mitochondriích může probíhat nezávisle na KAR [Cibulka, 2005].

Obr. 1. Vzorec L-karnitinu (3-hydroxy-4-N-trimethylaminomáselná kyselina)



Cytoplazmatické MK s dlouhým řetězcem (nejčastěji zbytky kyseliny palmitové) ve formě acyl-CoA jsou přeměněny na acyl-KAR pomocí enzymu karnitinacyltransferázy-I (nejčastěji karnitinpalmitoyltransferázy – CPT I, EC 2.3.1.21), která je umístěna ve vnější

mitochondriální membráně. V této reakci je acylová skupina přemístěna z CoA na hydroxylovou skupinu KAR. Vzniklý O-acyl-KAR je transportován přes vnitřní mitochondriální membránu pomocí karnitinacylkarnitintranslokázy (carnitine/acylcarnitine translocase – CACT), která transportuje acyl-KAR dovnitř výměnou za KAR transportovaný ven. Uvnitř mitochondrie potom acyl-KAR reaguje s intramitochondriálním CoA za katalýzy karnitinacyltransferázou-II (nejčastěji karnitinpalmitoyltransferázou – CPT II), vyskytující se na vnitřní straně vnitřní mitochondriální membrány. Tak je v mitochondriální matrix opět vytvořen acyl-CoA a uvolněn KAR, který je pomocí CACT opět přenesen do cytoplazmy. Tento děj se opakuje a bývá nazýván jako tzv. *shuttle mechanismus* (*shuttle* = kyvadlový) [McGarry & Brown, 1997]. Podobným mechanismem jsou transportovány produkty peroxizomální beta-oxidace jako estery KAR z peroxizomů do mitochondrií k jejich kompletní oxidaci na vodu a oxid uhličitý v Krebsově cyklu [Wanders *et al.*, 2001]. KAR však neslouží jen k zásobování mitochondrií zbytky kyselin určených k oxidaci, ale také k odstraňování toxických zbytků beta-oxidace v opačném směru, s jejich konečným vyloučením ledvinami. Stejně tak reguluje hladiny mnohých špatně metabolizovatelných acylových skupin, ať už mají exogenní nebo endogenní původ v důsledku vrozených poruch metabolismu. Tyto zbytky jsou konjugovány s CoA a v důsledku toho je snížena jeho volná frakce v buňce. KAR napomáhá vyloučit tyto zbytky jako acyl-KAR ven z buňky, a obnovit tak volnou frakci CoA. Podobně při nadměrné produkci acetylových zbytků (acetyl-CoA) v některé z metabolických drah přejímá KAR tyto zbytky v reakci katalyzované karnitinacetyltransferázou (CAT, EC 2.3.1.7).

KAR neovlivňuje jen metabolismus MK, ale také produkci energie z aminokyselin a sacharidů. Předpokládá se, že zvyšuje produkci energie z těchto zdrojů zvýšením aktivity enzymových komplexů pyruvátdehydrogenázy a fosfofruktokinázy v důsledku snížení intramitochondriálního poměru acetyl-CoA/CoA. Intramitochondriální pokles poměru acetyl-

CoA/CoA stimuluje aktivitu pyruvátdehydrogenázy, což vede ke zvýšené oxidaci glukózy. A právě tento poměr je regulován KAR, který tak rozhoduje, bude-li přednostně stimulována beta-oxidace MK nebo oxidace glukózy [Schönekeess *et al.*, 1995]. KAR tak moduluje přísun energie z různých oxidačních pramenů.

3.2. Metabolismus L-karnitinu

Již výše bylo uvedeno, KAR je obsažen zejména v živočišné stravě. Kromě KAR přijímaného potravou (exogenního) je lidský organismus zčásti schopen krýt potřebu endogenní syntézou. Množství syntetizovaného KAR je odhadováno na 1,2 $\mu\text{mol/kg}$ denně. Běžná strava zajišťuje přívod KAR v množství 2–12 $\mu\text{mol/kg}$ denně, z čehož 70–80 % je vstřebáno do krve. Průměrně tedy 25 % KAR z celkového množství představuje endogenní tvorba a 75 % připadá na KAR přijatý potravou. Ve vyspělých zemích se u zdravých jedinců nedostatek KAR způsobený jeho nedostatkem v potravě tedy prakticky nevyskytuje [Cibulka, 2005].

Endogenní KAR je syntetizován ze dvou esenciálních aminokyselin, lysinu a methioninu. Lysin poskytuje zdroj dusíku a uhlíkatý řetězec, zatímco S-adenosylmethionin dodává tři methylové skupiny [Bremer, 1983]. K tvorbě KAR je dále zapotřebí vitamin C, pyridoxin, niacin a železo. Nejprve dochází k methylaci lysinu S-adenosylmethioninem za účasti specifické lysinmethyltransferázy (ϵ -N-L-lysine methyltransferase) a vzniká ϵ -N-trimethyllysin (TML). Ten je dále hydroxylován v pozici beta TML-hydroxylázou (EC 1.14.11.8) na β -hydroxytrimethyllysin (HTML), který je rozštěpen HTML-aldolázou (EC 4.1.2. 'X') na γ -trimethylaminobutyraldehyd (TMABA) a glycin. TMABA je postupně oxidován TMABA-dehydrogenázou (EC 1.2.1.47) na γ -butyrobetain (γ -BB). V konečné fázi je γ -BB hydroxylován γ -BB-hydroxylázou (EC 1.14.11.1) v pozici beta a vzniká tak molekula KAR [Vaz & Wanders, 2002]. Zatímco přeměna TML na γ -BB probíhá prakticky ve všech

tkáních, enzym γ -BB-hydroxyláza, který katalyzuje poslední krok biosyntézy KAR, je u člověka přítomen pouze v játrech, ledvinách a mozku [Vaz *et al.*, 1998]. Předpokládá se, že γ -BB se z větší části tvoří v periferních tkáních (zejména v kosterních svalech) a odtud je transportován krví do syntetizujících tkání. Vzniklý KAR je potom opět vyplavován do krve a vyčytáván periferními tkáněmi. Ve většině tkání je koncentrace KAR 20 až 50 krát vyšší než v plazmě. Byla prokázána existence aktivního transportního systému, který přenáší KAR do buňky proti koncentračnímu gradientu (*organic cation/carnitine transporter* – OCTN2), méně významný je pasivní přenos. Mezi buňkami jednotlivých tkání je velká variabilita v míře transportu KAR a z toho vyplývající rozdíly v jeho koncentraci. Transport závisí na extracelulární koncentraci natria, pravděpodobně se tedy jedná o mechanismus společného transportu s natriem [Prasad *et al.*, 1996]. Systém přenašečů pro KAR byl popsán u pacientů s deficitem KAR a s elektrolytovou dysbalancí, u kterých substituce KAR vedla k normalizaci jeho hladiny v plazmě, ale koncentrace ve tkáních zůstala nízká.

Stejný transportní mechanismus se vyskytuje v buňkách střevní sliznice, kde zajišťuje absorpci exogenního KAR, a v tubulárním systému ledvin. Zde je 90 až 95 % profiltrovaného KAR zpět reabsorbováno. Zbytek je vyloučen ve formě acyl-KAR močí. Jedná se o množství 100–300 $\mu\text{mol}/\text{den}$, stolicí odchází jen asi 1 % močových ztrát [Wagenmakers, 1991]. Proces reabsorpce je saturovatelný, závisí na gradientu natria, tělesné teplotě a vykazuje strukturální specifitu. Je-li překročen ledvinový práh při vysokých koncentracích v séru (např. při i. v. injekci), je KAR rychle vylučován močí. Renální reabsorpce má tedy významnou úlohu v udržování homeostázy KAR. Střevní resorpce KAR přijatého potravou probíhá zejména v duodenu a jejunu, méně v ileu. Bylo zjištěno, že KAR je do buněk střevní sliznice poměrně lehce přijat, ale pomalu je vydáván do oběhu. Po perorálním podání se plazmatická hladina zvýší až po 8 hodinách. Proto se v substituční léčbě doporučuje podávat spíše dlouhodobě malé dávky. Ke sníženému vstřebávání dochází za snížené dodávky energie (jako jsou např.

stavy ischemie), při nedostatku iontu natria, ale také za přítomnosti *D*-formy karnitinu a acetylkarnitinu (acetyl-KAR). Uvažuje se též o regulační úloze kalmodulinu; tyto pochody však nejsou ještě plně objasněny. Jak se zdá, má množství KAR přijatého potravou větší význam, než se dosud předpokládalo [Cibulka, 2005].

3.3. Deficit L-karnitinu

Beta-oxidace MK v mitochondriích má zásadní význam pro energetický metabolismus organismu. Při deficitu KAR dochází k poruše tohoto procesu a k výrazným metabolickým změnám v buňce. Energie se získává alternativním pochodem, převážně oxidací glukózy. Snižuje se intracelulární hladina draslíku, zvyšuje se koncentrace sodíku a vápníku [Kolář, 1994]. Buňky trpí edémem, dochází k poruše produkce ATP. MK nejsou odbourávány, hromadí se v cytosolu a podléhají ve zvýšené míře procesům oxidace a peroxidace, což může vést až k nekróze buňky [Shug & Subramanian, 1987]. Často přítomné poruchy jaterních funkcí mají za následek vznik hyperamonémie a hypoglykémie pro zvýšenou spotřebu glukózy jako zdroje energie [Hou, 2002].

Rozlišujeme dva základní typy deficitu KAR: primární a sekundární [Brenningstall, 1990; Rebouche & Engel, 1983]. Tzv. syndrom primárního deficitu KAR je podmíněn geneticky a dělí se na systémový a myopatický typ. Systémový typ charakterizuje generalizovaný nedostatek KAR ve všech tkáních. V popředí jsou projevy kardiomyopatie, hepatopatie a mozkové encefalopatie. Může se projevovat jako tzv. Reye-like syndrom s hypoglykemií a hypoketonémickým syndromem. Do obrazu choroby patří také ponámahové rabdomyolýzy spojené se svalovou hypotonií a slabostí. Postižení dlouho nepřežívají, upadají do kómatu, dochází k selhání srdce [Hou, 2002]. Myopatický typ patří do skupiny chorob nazývaných jako *lipid storage diseases*. Charakterizuje ho akumulace lipidů v kosterním svalstvu s projevy slabosti kořenového svalstva horních i dolních končetin [Karmaniolas *et*

al., 2002]. Příčinou primárního deficitu KAR jsou defekty v genech řídících činnost enzymů, které jsou nezbytné pro správné fungování KAR metabolismu na různých úrovních. Například byla identifikována mutace genu OCTN2, která má za následek poruchu transmembránového přenašeče pro KAR [Nezu *et al.*, 1999]. Dále byly popsány defekty všech tří základních enzymů zabezpečujících správný chod mitochondriálního *shuttle* systému (CPT I, CACT, CPT II). Jedná se o závažné genetické poruchy, často končící letálně již krátce po narození dítěte [Slama *et al.*, 1996].

V praxi se podstatně častěji vyskytuje tzv. syndrom sekundárního nedostatku KAR. Nejčastěji vzniká v důsledku nadměrného vylučování ledvinami. Zvýšená produkce esterů KAR provází různé vrozené poruchy metabolismu aminokyselin (organické acidurie) nebo velkou fyzickou zátěž. Kyselé produkty metabolismu se vážou na molekulu KAR a jako estery KAR jsou vylučovány ledvinami. Tímto způsobem organismus ztrácí volný (neesterifikovaný) KAR. Další stavy, při kterých se setkáváme s nedostatkem KAR, jsou choroby ledvin, chronická hemodialýza, jaterní cirhóza, myxedém, hypopituitarismus, adrenokortikální insuficience, chronická Duchenneova myopatie, AIDS, ischemická choroba srdeční. Za zmínku stojí i nutričně deficitní stavy jako kwashiorkor, hladovění, skorbit, všechny choroby spojené s malabsorpcí či vegetariánské diety [Cibulka, 2005]. Velmi ohroženou skupinou pacientů jsou předčasně narození novorozenci. U nich může i krátkodobý nedostatek stravy, popřípadě infekční onemocnění, způsobit závažné stavy hypoglykémie. V neposlední řadě může být deficit KAR způsoben iatrogeně, podáváním valproátu při léčbě epilepsie nebo nevhodně sestavenou totální parenterální výživou. Při léčbě sekundárního nedostatku KAR je třeba léčit základní příčinu onemocnění a – pokud je to možné – snažit se obohatit stravu o tzv. KAR báze, sestávající z lysinu, methioninu a vitamínu C. V indikovaných případech prokázaného nedostatku je možno přikročit k suplementaci KAR [Cibulka, 2005].

3.4. Deficit L-karnitinu u hemodialyzovaných nemocných a význam jeho suplementace

U nemocných s chronickým renálním selháním léčených hemodialýzou dochází k výraznému deficitu KAR. Podílí se na něm jednak častá proteino-energetická malnutrice při chronické renální insuficienci, jednak porucha endogenní biosyntézy ztrátou funkčního parenchymu ledvin a někdy i poškozením funkce jater. V průběhu dialýzy pak dochází k významným ztrátám přes dialyzační membránu z důvodu malé molekulové hmotnosti KAR [Bohmer *et al.*, 1978]. Výsledkem jsou velmi nízké hodnoty volného KAR a kumulace vázaného acyl-KAR, který při renální nedostatečnosti vzniká ve zvýšeném množství a je špatně dialyzovatelný. Poměr acyl-KAR/volný KAR vyšší než 0,4 je ukazatelem deficitu KAR [Golper & Ahmad S, 1992].

Referenční hodnoty pro volný KAR v séru uváděné v literatuře nejsou jednotné. Thomas *et al.* uvádí interval 24,6–51,0 $\mu\text{mol/l}$ u mužů a 17,9–45,5 $\mu\text{mol/l}$ u žen [Thomas, 1998]. V literatuře bylo popsáno, že během dialýzy dochází ke snížení koncentrace volného KAR asi na jednu třetinu hodnoty před dialýzou. Bylo také zjištěno, že dlouhodobý pokles plazmatického i svalového KAR je přímo úměrný délce dialyzační léčby [Goral, 2001]. Nedostatek KAR se odráží na klinickém stavu hemodialyzovaných nemocných. Dochází u nich k poruše energetického metabolismu s nedostatečnou tvorbou ATP. V klinickém obraze dominují příznaky postižení kosterního svalstva a myokardu. Vzniká myopatie a kardiomyopatie, které se projevují svalovou slabostí, únavou, špatnou tolerancí zátěže, křečemi, intradialyzační hypotenzí, dysfunkcí levé komory srdeční a vyšším výskytem arytmií. Myopatie z nedostatku KAR se projevuje (jako myopatie jiného původu) především slabostí pletencového svalstva končetin a svalstva trupu [Cibulka *et al.*, 2005].

Bylo provedeno mnoho klinických studií, které zkoumaly účinky KAR u různých onemocnění. Hemodialyzovaní nemocní jsou vhodným modelem pro takový výzkum z důvodu prokázaného deficitu KAR. Některé z těchto studií prokázaly pozitivní vliv

suplementace na rozvoj komplikací dialyzační léčby. Bellinghieri et al. zaznamenali pokles výskytu některých symptomů postižení svalů (svalové křeče, astenie) u 14 dialyzovaných pacientů suplementovaných KAR per os [Bellinghieri *et al.*, 1983]. V multicentrické americko – italské studii bylo zaznamenáno výrazné subjektivní zlepšení zdravotního stavu dialyzovaných nemocných po pravidelné suplementaci KAR. Autoři pozorovali například zmírnění svalové slabosti, křečí, intradialyzační hypotenze, bolestí na hrudi, únavy a dalších symptomů. Někteří pacienti popisovali zlepšení chuti k jídlu a zvýšení sexuální výkonnosti [De Felice *et al.*, 1996]. K všeobecně nejuznávanějším patří účinky KAR na parametry výživy. Zde je KAR v současné době asi nejvíce využíván jako součást různých potravinových doplňků pro sportovce (zvýšení výkonnosti, zlepšení regenerace, přednostní utilizace tuků jako zdroje energie). U hemodialyzovaných nemocných je známo, že často trpí malnutricí a poruchou metabolismu lipidů. Jednou z příčin je i deficit KAR [Ahmad *et al.*, 1990]. Je popisováno, že suplementace KAR u těchto nemocných vede zejména k poklesu plazmatické koncentrace TAG. Maeda et al. zjistili, že léčba KAR během dialyzační léčby vede ke snížení plazmatické hladiny volných MK [Maeda *et al.*, 1989]. Dále byl v některých studiích zaznamenán pokles celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu, a naopak vzestup HDL-cholesterolu a plazmatické koncentrace albuminu [Bellinghieri *et al.*, 2003; Veselá *et al.*, 2001]. Jelikož KAR stimuluje některé klíčové glykolytické enzymy, dá se předpokládat, že by mohl pozitivně ovlivňovat i poruchu glukózové tolerance a inzulínovou rezistenci, které se často u pacientů s renálním selháním vyskytují. Některé studie tyto předpoklady skutečně potvrzují [Günel *et al.*, 1999; Vazelov *et al.*, 2003]. Asi nejvíce prozkoumanou oblastí je v tomto směru vztah mezi deficitem KAR a rozvojem anémie u hemodialyzovaných nemocných. Bylo napsáno mnoho prací o pozitivním vlivu suplementace KAR na červený krevní obraz. Bérard et al. zjistili, že se na vzniku anémie u těchto nemocných podílí kromě nedostatku renálního EPO i zvýšená fragilita erytrocytární membrány. Tato fragilita,

stanovovaná pomocí tzv. AGL testu (*the acidified glycerol lysis test*), se signifikantně snížila při pravidelném podávání KAR po každé dialýze [Bérard *et al.*, 1994]. Tento jev popsal již v roce 1987 Labonia, který pozoroval vzestup hematokritu u pacientů na dialýze suplementovaných KAR. Mechanismus účinku vysvětlil zvýšením transportu a oxidace MK, čímž dochází k redukci plazmatické koncentrace inhibitorů Na⁺/K⁺-ATPázy [Labonia *et al.*, 1987]. Mnohé klinické studie zaznamenaly snižování dávek rHuEPO během léčby KAR u hemodialyzovaných nemocných [Bohmer *et al.*, 1978; Boran *et al.*, 1996]. Výsledky těchto výzkumů naznačují, že se nedostatek KAR významně podílí na zvýšené fragilitě erytrocytů a negativně ovlivňuje účinnost léčby EPO [Golper *et al.*, 2003], jak již bylo naznačeno výše. Podle National Kidney Foundation se léčbu KAR doporučuje zahájit u vybraných pacientů s anémií nedostatečně reagující na léčbu rHuEPO v dávce 1 g intravenózně (i.v.) po každé dialýze [National Kidney Foundation, 2000]. Zatím spíše ojedinělé informace máme o vztahu mezi nedostatkem KAR a rozvojem oxidačního stresu. Vzhledem k zásadní úloze KAR v procesu beta-oxidace MK lze předpokládat, že jeho nedostatek vážným způsobem narušuje energetický metabolismus buňky a podporuje oxidační stres [Shug & Subramanian, 1987]. V posledních letech byly prováděny některé experimentální a klinické studie, které zkoumaly vliv podávání KAR na rozvoj oxidačního stresu. Hagen *et al.* se zabývali studiem mitochondriálních funkcí v procesu stárnutí u laboratorních potkanů. Podávali samotný acetyl-KAR a acetyl-KAR v kombinaci s kyselinou lipoovou 24–28 měsíců starým zvířatům, změřené parametry srovnávali se zvířaty starými 2–4 měsíce. V suplementované skupině došlo k výraznému vzestupu mitochondriální aktivity, posuzované pomocí měření průměrného potenciálu mitochondriální membrány, dále došlo k vzestupu intracelulární hladiny vitamínu C a poklesu malondialdehydu (MDA), jakožto ukazatele lipidové peroxidace [Hagen *et al.*, 2002]. Kumaran *et al.* prokázali v podobné studii pokles aktivit antioxidantních enzymů superoxidodismutázy (SOD), katalázy a glutathionperoxidázy (GPx)

v krevní plazmě a v buňkách příčně pruhovaných svalů u potkanů suplementovaných KAR [Kumaran *et al.*, 2003]. Výrazné antioxidační účinky KAR prokázali Sener *et al.* v nedávné studii prováděné na potkanech s chronickým renálním selháním [Sener *et al.*, 2004]. Výše uvedené výsledky studií na laboratorních zvířatech ukazují, že by suplementace KAR mohla mít pozitivní vliv na ovlivnění oxidačního stresu u pacientů s chronickým selháním ledvin léčených hemodialýzou i u ostatních rizikových skupin nemocných. Klinické zkušenosti v této oblasti jsou však zatím malé. Za zmínku stojí studie Veselé *et al.*, ve které se zkoumal vliv podávání KAR na lipidový metabolismus, červený krevní obraz a především metabolismus VR u hemodialyzovaných pacientů. U suplementovaných jedinců došlo k signifikantnímu vzestupu koncentrace redukovaného glutathionu (GSH) v erytrocytech, dále došlo k vzestupu celkové antioxidační kapacity plazmy, zatímco výrazně poklesla plazmatická hladina MDA [Veselá *et al.*, 2001]. Ceriello se zabývá zkoumáním oxidačního stresu u diabetu mellitu. Ve své souhrnné práci popisuje účinky různých látek na metabolismus VR [Ceriello, 2003]. Vyzdvihuje v ní zejména antioxidační efekt KAR a kyseliny lipoové a odkazuje na další experimentální a klinické studie, ve kterých se tento efekt prokázal. Podle výsledků výše zmíněných studií působí KAR jako významný antioxidant u hemodialyzovaných nemocných i u dalších chorobných stavů.

Zcela nové souvislosti se rýsují v oblasti kalciofosfátového metabolismu. Jak bylo uvedeno výše, nemocní s chronickým selháním ledvin mají sklon k rozvoji hyperparathyreózy, která má za následek vznik renální kostní choroby. Základní léčebnou strategií je úprava sérových hladin vápníku a fosfátů [Slatopolsky *et al.*, 1996]. Některé klinické studie prokázaly pozitivní vliv KAR na tuto oblast metabolismu u hemodialyzovaných pacientů. Ahmad *et al.* zjistili, že došlo k signifikantnímu poklesu sérové hladiny fosfátů ve skupině nemocných suplementovaných KAR oproti placebo [Ahmad *et al.*, 1990]. Ve studii Veselé došlo také k poklesu fosfatémie u karnitinové skupiny, počet pacientů

s hyperfosfatémií klesl po šestiměsíční léčebné kůře z původních 78 % na 22 % [Veselá *et al.*, 2001]. Uvedené výsledky je možné vysvětlit celkovým zlepšením energetického metabolismu buněk a zvýšením produkce ATP.

V září 2002 bylo vydáno doporučení National Kidney Foundation, které se týká léčebného podávání KAR u hemodialyzovaných nemocných [Eknoyan *et al.*, 2003]. Substituční léčbu se podle tohoto dokumentu doporučuje zahájit u těch pacientů, u kterých se vyvinul tzv. DRCD (*dialysis-related carnitine disorder*) syndrom, charakterizovaný souborem klinických a laboratorních příznaků souvisejících s nedostatkem KAR. Jako vodičko v léčbě se používají zejména 4 hlavní skupiny klinických příznaků: anémie špatně reagující na léčbu rHuEPO, intradialyzační hypotenze, příznaky postižení myokardu (subjektivní - NYHA III-IV i objektivní), svalová slabost a únava. Doporučená dávka je 20 mg KAR/kg tělesné hmotnosti i.v. po skončení každé dialýzy. Léčba by měla být dlouhodobá, efekt by měl být hodnocen v tříměsíčních intervalech. V případě, že se výše zmíněné příznaky DRCD syndromu nezlepší během 9 až 12 měsíců suplementace, doporučuje se tuto léčbu ukončit. Pokud léčba má příznivé účinky, mělo by se v podávání KAR pokračovat.

4. Cíl studie

V pilotní studii bylo sledováno 12 nemocných v pravidelném dialyzačním léčení po dobu 9 měsíců, kdy 6 měsíců byli suplementováni KAR 3x týdně (vždy po dialýze 15mg/kg tělesné hmotnosti i.v.). Byl zkoumán účinek KAR na červený krevní obraz, kdy příznivý vliv suplementace byl již opakovaně prokázán, dále pak ovlivnění lipidového metabolismu, stav nutriční, ukazatele metabolismu VR, antioxidační ochrana a některé parametry kalciofosfátového metabolismu [Veselá *et al.*, 2001].

Vzhledem k tomu, že výsledky u 12 nemocných přinesly řadu pozitivních nálezů a i některé nečekané, jako například příznivé ovlivnění hyperfosfatémie dialyzovaných

nemocných, rozhodli jsme se provést širší studii, kde bychom mohli tyto první nálezy potvrdit.

Hlavním cílem tohoto projektu tedy bylo zaměřit se na vliv suplementace KAR na změny některých metabolických parametrů, který by měly být příznivě ovlivněny podporou intramitochondriální beta-oxidace. Patří k nim vedle metabolismu lipidů a zlepšení nutriční, podle našich předchozích zkušeností, také ovlivnění oxidačního stresu a kalciofosfátového metabolismu a tedy možnost zpomalení rozvoje aterosklerózy a renální kostní choroby u hemodialyzovaných nemocných.

Dalším cílem bylo adaptovat ruční fotometrickou metodu na stanovení volného KAR pro použití na automatickém biochemickém analyzátoru.

5. Soubor nemocných

Do studie bylo zařazeno celkem 112 nemocných (78 mužů a 34 žen) v pravidelném hemodialyzačním programu v dialyzačních střediscích EuroCare v Plzni (52 nemocných) a v Teplicích (60 nemocných). Minimální doba dialyzační léčby byla 3 měsíce, jinak nebyla užita žádná speciální kritéria pro zařazení do studie. Zařazení byli tedy všichni chronicky hemodialyzovaní pacienti, kteří podepsali informovaný souhlas. Průměrný věk těchto pacientů byl $62,0 \pm 12,5$ roků; střední hodnota délky dialyzační léčby byla 17 měsíců (minimum = 3 měsíce, maximum = 189 měsíců). Všichni pacienti byli dialyzováni 3x týdně po dobu 4 hodin. Co se týká příčin, které vedly u našich pacientů ke vzniku chronického renálního selhání, byly následující: chronická glomerulonefritida (17,6 % nemocných), intersticiální nefritida (29,6 % nemocných), diabetická nefropatie (29,6 % nemocných), polycystické ledviny (6,5 % nemocných) a ostatní příčiny (16,7 % nemocných).

Před začátkem studie byli nemocní náhodně randomizováni do dvou věkem i pohlavím si odpovídajících skupin. Jedné z nich byl podáván KAR, zatímco druhá sloužila

jako kontrolní – místo KAR byl podáván stejný objem izotonického roztoku chloridu sodného. Během studie bylo vyřazeno 25 nemocných z následujících důvodů: úmrtí (16 nemocných), transplantace ledvin (6 nemocných), nedostatečné dodržování léčebného režimu ze strany pacienta – špatná *compliance* (2 nemocní), změna bydliště (1 nemocný), návrat funkce ledvin (1 nemocný). Celkem tedy studii předčasně ukončilo 26 nemocných a řádně dokončilo 86 nemocných. Výsledky u nemocných, kteří měli během studie změnu v léčebném režimu (např. v dávkování vitamínu D či jiných léků, změnu dialyzační membrány nebo dialyzačního roztoku apod.), nebyly hodnoceny. Žádný pacient neodstoupil ze studie na základě jakýchkoli nežádoucích subjektivních příznaků. Nemocní, kteří nedokončili studii z důvodu úmrtí, pocházeli jak ze suplementované skupiny (7 nemocných), tak z kontrolní skupiny (9 nemocných).

6. Design studie

Studie byla řádně oznámena Státnímu ústavu pro kontrolu léčiv v Praze a tímto byla schválena. Studie byla taktéž schválena Lokální etickou komisí LF UK a FN v Plzni.

Studie začala na počátku října 2003 a probíhala do počátku července 2004 (tj. 9 měsíců). Protože 5 nemocných bylo do studie zařazeno o 3 měsíce později, byli tito nemocní vyšetřováni s tříměsíčním zpožděním (tj. naposledy počátkem října 2004).

K suplementaci byl užit KAR od firmy Fresenius Kabi Austria GmbH (Graz, Austria), ampule obsahující 1 g KAR. Nemocným byl podáván po skončení každé hemodialýzy, tj. 3x týdně po dobu 6 měsíců. Aplikace KAR byla i.v. v dávce 15 mg/kg tělesné hmotnosti.

Kompletní laboratorní vyšetření bylo provedeno z náběru žilní krve před zahájením studie, po 3 měsících suplementace, a po jejím skončení, tj. po 6 měsících. Stejná vyšetření byla prováděna u suplementovaných osob i u kontrolní skupiny bez suplementace. Některé základní metody byly prováděny častěji (1x měsíčně), zatímco jiné speciální byly z finančních

důvodů provedeny pouze 2x, tj. na začátku studie a po 6 měsících suplementace (viz níže). Všechny náběry byly provedeny před hemodialýzou, pouze hladina volného KAR byla vyšetřována i po dialýze. Kromě níže uvedených laboratorních parametrů byly sledovány i některé klinické ukazatele, například hmotnost nemocných, krevní tlak a komplikace hemodialýzy (jako např. hypotenze, arytmie, křeče; nemocní hodnotili i subjektivní stav, tj. svalovou sílu, únavnost aj.).

Během studie byly sledovány následující laboratorní parametry (v závorkách je uvedena četnost vyšetření; např. 0, 3, 6 znamená, že dané laboratorní vyšetření bylo provedeno před zahájením studie, po 3 měsících suplementace KAR a po 6 měsících suplementace KAR):

- volný KAR (0, 3, 6; 7 a 8 jen u suplemenovaných pacientů);
- červený krevní obraz a týdenní dávky rHuEPO (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6);
- parametry lipidového metabolismu: celkový cholesterol, HDL- a LDL-cholesterol, Lp(a), TAG (0, 3, 6);
- ukazatele nutriční a zánětlivé: albumin (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6), prealbumin, transferin (0, 3, 6), C-reaktivní protein (CRP) (0, 6);
- ukazatele oxidačního stresu: antioxidační enzymy SOD a GPx, GSH v erytrocytech, MDA resp. látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou (*thiobarbituric acid-reactive substances* – TBARS), oxidované LDL částice (oxLDL), produkty pokročilé glykace (*advanced glycation end-products* – AGE látky), produkty pokročilé oxidace proteinů (*advanced oxidation protein products* – AOPP) (0, 6);
- kalciofosfátový metabolismus a ukazatele kostní přestavby: vápník celkový, anorganické fosfáty, kalciofosfátový součin (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6), kostní izoenzym ALP (b-ALP), PTH, osteokalcin (OC) a osteoprotegerin (OPG) (0, 6).

Všechna laboratorní vyšetření byla provedena na Ústavu klinické biochemie a hematologie Lékařské fakulty (LF) Univerzity Karlovy (UK) a Fakultní nemocnice (FN) Plzeň, kromě stanovení b-ALP, PTH, OC a OPG, která byla provedena v laboratoři Úseku imunodiagnostiky Oddělení nukleární medicíny FN Plzeň.

Ke statistickému zhodnocení výsledků byly použity programy SAS (*Statistical Analysis Software*), verze 8,02; Statistica 98 Edition a MedCalc, verze 8,1. Kromě základní deskriptivní statistiky bylo sledováno rozložení proměnných v daných skupinách (pomocí *Smirnov-Kolmogorovova* testu). Výsledky obou skupin nemocných byly porovnávány nepárově (pomocí *Mann-Whitney* testu), což nás zajímalo zejména na začátku studie, abychom zjistili, zda se obě skupiny od sebe neliší. Dále byly změny v obou skupinách vyhodnoceny párově (pomocí *Wilcoxonova* testu), konkrétně výsledky po 3 a 6 měsících suplementace byly srovnány s hodnotami na počátku studie (tj. měsíc 3 a 6 proti měsíci 0). Dále byl hledán vztah mezi jednotlivými parametry a jejich změnami během suplementace za pomoci metody lineární regrese a výpočtem korelačních koeficientů (podle *Spearmana*). Byla užitá i metoda vícečetné logistické regresní analýzy (*multivariate stepwise logistic regression analysis*) k posouzení míry uplatnění jednotlivých možných faktorů na zjištěných změnách v oblasti kalciofosfátového a kostního metabolismu.

U nemocných byly dále zaznamenávány jejich subjektivní potíže a klinické příznaky, které by mohly mít vztah k deficitu KAR a které by mohla suplementace ovlivnit. Patřily mezi ně: slabost, únava, křeče v dolních končetinách, hypotenze v průběhu hemodialýzy, arytmie (zejména v průběhu hemodialýzy).

Dále byly zaznamenávány následující údaje: druh onemocnění, které vedlo k selhání ledvin, datum zařazení do dialyzačního programu, typ dialyzačních membrán a roztoků, délka dialýzy, úbytek hmotnosti při dialýze, reziduální diuréza, dávky rHuEPO, suplementace vitamínem D (preparát a dávka). Parametry dialýzy (délka, typ membrány) nebyly u

jednotlivých nemocných během studie měněny. Léčba byla upravována jen v indikovaných případech, kdy by bez její úpravy hrozilo zhoršení stavu nemocného.

Bylo provedeno statistické zhodnocení výsledků studie, a to v následujících blocích:

- zhodnocení změn hladiny volného KAR během hemodialýzy a dlouhodobě vlivem suplementace;
- zhodnocení vlivu suplementace KAR na červený krevní obraz a týdenní dávky rHuEPO
- zhodnocení vlivu suplementace KAR na metabolismus lipidů;
- zhodnocení vlivu suplementace KAR na ukazatele nutrice a zánětu;
- zhodnocení vlivu suplementace KAR na ukazatele oxidačního stresu a antioxidační ochrany;
- zhodnocení vlivu suplementace KAR na ukazatele kalciofosfátového a kostního metabolismu se zvláštním zřetelem na sekundární hyperparathyroidismus.

Největší důraz byl kladen na poslední dva jmenované bloky, tj. na oxidační stres a kalciofosfátový metabolismus.

7. Metody stanovení

7.1. Stanovení L-karnitinu

Co se týká analytické části studie, jedním z cílů bylo adaptovat fotometrickou metodu na stanovení volného KAR, určenou výrobcem pro manuální zpracování, pro použití na automatickém analyzátoru. Použili jsme enzymatický fotometrický test firmy Roche (Mannheim, SRN) a analyzátor AU 400 firmy Olympus (Mishima, Japonsko).

Jedná se o stanovení volné frakce KAR, princip detekce popisovaný výrobcem je následující: volný CAR je acetylován na acetyl-KAR pomocí acetyl-CoA za přítomnosti enzymu CAT. Jako vedlejší produkt této reakce vzniká volný CoA, který je acetylován zpět

na acetyl-CoA za přítomnosti ATP a zbytku kyseliny octové (acetátu) enzymem acetyl-CoA syntázou. ATP je při této reakci štěpen až na adenosin-5-monofosfát a anorganický pyrofosfát. Za přítomnosti ATP a enzymu myokinázy se 2 molekuly vzniklého adenosin-5-monofosfátu spojí a vytvoří adenosin-5-difosfát. Ten je konvertován v pozdější reakci na fosfoenolpyruvát enzymem pyruvátkinázou. Fosfoenolpyruvát pak poskytuje pyruvát, který je přeměňován na *L*-laktát za přítomnosti laktátdehydrogenázy a redukovaného nikotinamidadeninukleotidu (NADH). Množství NADH spotřebované během reakce je ekvivalentní jedné polovině volného KAR ve vyšetřovaném vzorku. NADH se kvantifikuje fotometricky měřením absorpance při 340 nm.

Postupovali jsme podle návodu výrobce, avšak s určitými vlastními modifikacemi: žilní krev byla odebrána do zkumavek obsahujících jako protisrážlivé činidlo draselnou sůl kyseliny etylendiaminotetraoctové (K_3EDTA). Krevní plazma byla zpracována obvyklým způsobem a deproteinizována pomocí roztoku kyseliny chloristé o koncentraci 0,6 mol/l v poměru 1:1 (0,5 ml + 0,5 ml). Následovalo důkladné promíchání, inkubace v ledové lázni po dobu 10 minut a centrifugace roztoku rychlostí 3000 x g po dobu 10 minut. 0,5 ml supernatantu bylo smícháno s 0,5 ml roztoku uhličitany draselného o koncentraci 1,2 mol/l za účelem úpravy pH. Vzniklá směs byla inkubována v ledové lázni po dobu 20 minut a potom centrifugována rychlostí 3000 x g po dobu 5 minut. Supernatant byl zmrazen na teplotu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a v této formě byl uchován až do vlastní analýzy (přibližně 3 měsíce).

Stanovení KAR soupravou firmy Roche je vyvinuto pro manuální zpracování. Nevýhodou této metody je nutnost pracovat s relativně velkými objemy vzorků i reagentů. Reakce je zdlouhavá (přibližně 40 minut) a velice pracná. Jedná se o několikastupňový proces, ve kterém jsou postupně míchány 3 typy vzorků a činidel. Absorbance jednotlivých vzorků je měřena opakovaně v průběhu tohoto procesu a koncentrace volného KAR je

nakonec vypočítána z rozdílu absorbancí slepého vzorku (vzorek deionizované vody), rozdílu absorbancí vzorku a dalších fyzikálních veličin [Roche Diagnostics GmbH,].

Jelikož jsme chtěli adaptovat výše popsanou metodu na automatický analyzátor Olympus AU 400, bylo nutné ji modifikovat tak, aby se používaly pouze 2 reagenční roztoky v menších objemech, odpovídajících technickým parametrům analyzátoru. Souprava na stanovení volného KAR dodávaná firmou Roche obsahuje 3 lahvičky číslo (č.) 1 a dále po jedné lahvičce č. 2, 3, 4 a 5. Přesné složení roztoků v jednotlivých lahvičkách uvádí firma Roche na svých internetových stránkách [Roche Diagnostics GmbH,] nebo je k dispozici v námi publikovaném sdělení [Cibulka *et al.*, 2006].

Podle návodu k použití soupravy se má veškeré množství roztoku z lahvičky č. 1 rozpustit v 10 ml deionizované vody a smíchat s 1 ml detergentu z lahvičky č. 5. Vzniklý roztok (roztok č. 1) je stabilní po dobu 4 dní při teplotě 2–8 °C. Roztoky v lahvičkách č. 2, 3 a 4 jsou použitelné bez zvláštní přípravy, jsou stabilní po dobu 1 roku při teplotě 2–8 °C. Mají být postupně přidávány do reakční směsi až do dosažení konečného objemu 2 205 ml.

Naše modifikace této metody byla následující: roztok č. 1 byl smíchán s roztokem č. 2 (suspenze z lahvičky č. 2 zředěná v poměru 1:10 s deionizovanou vodou) v poměru 1:1. Vzniklý roztok byl použit jako roztok R1 v analyzátoru Olympus AU 400. Jeho stabilita byla sledována měřením kontrolního materiálu vždy před sérií vyšetření zkoumaných vzorků a taktéž po ní. Roztok R2 pro analyzátor Olympus AU 400 byl připraven smícháním roztoku z lahvičky č. 3 s roztokem pufru trihydroxymethylaminomethanu (*Tris buffer*), o koncentraci 0,1 mol/l. 75 µl roztoku R1 bylo automaticky zředěno se 75 µl vody a přidáno k 25 µl vzorku nebo roztoku standardu. Tato směs byla inkubována se startovacím roztokem R2 při 37 °C po dobu 5 minut. Pokles absorbance při 340 nm byl měřen kineticky mezi 12. a 27. fotometrickým bodem.

Testovali jsme některé analytické vlastnosti výše popsané modifikované metody na stanovení volného KAR. Byly použity kontrolní vzorky zaslané v rámci systému externí kontroly kvality ERNDIM (*European Research Network for Evaluation and Improvement of Screening, Diagnosis and Treatment of Inherited Disorders of Metabolism*), dále kontrolní materiál ze soupravy firmy Roche, a také vlastní vzorky. Kromě vzorků hemodialyzovaných nemocných (viz Soubor nemocných) jsme stanovili volný KAR také u 68 dárců krve z Transfúzního oddělení FN v Plzni. Jednalo se o skupinu 46 mužů a 22 žen o průměrném věku $37,9 \pm 11,6$ roků. Vyšetřením této skupiny osob jsme určili parametrickou metodou vlastní referenční hodnoty pro volný KAR v séru v rozmezí $40,1 \pm 17,8$ $\mu\text{mol/l}$. Velikost odchylky (*mean bias*) byla získána měřením 8 kontrolních vzorků systému externí kontroly kvality ERNDIM s výsledkem 5,1 %. Citlivost metody byla určena výpočtem meze stanovitelnosti (*limit of quantification*) na 2,6 $\mu\text{mol/l}$. Reprodukovatelnost v sérii byla vyjádřena variačním koeficientem (*inter-assay coefficient of variation*) o hodnotě 8,3 %. Analytická návratnost (*analytical recovery*) byla stanovena užitím standardního přídatku syntetického KAR ke vzorku o známé koncentraci KAR (58,5 $\mu\text{mol/l}$) na 101,8 %; 99,5 % a 95,4 % [Cibulka *et al.*, 2006].

Za hlavní výhodu naší modifikované metody oproti původní manuální metodě považujeme menší spotřebu vzorků a reagensů. Modifikace umožnila zvýšit počet stanovení proti manuálnímu provedení 12,6 krát a navíc díky automatizaci zrychlit a zpřesnit vlastní proces.

7.2. Ostatní metody stanovení

Ostatní metody stanovení budou probrány jen velmi stručně.

7.2.1. Stanovení červeného krevního obrazu

Červený krevní obraz byl vyšetřen na přístroji Sysmex 9000 R (Shanghai, Japonsko).

7.2.2. Stanovení parametrů lipidového metabolismu

Na stanovení parametrů lipidového metabolismu (celkový cholesterol, HDL- a LDL-cholesterol, TAG) byly užity běžné fotometrické metody na analyzátoru Olympus AU 400. Celkový cholesterol a TAG byly stanoveny enzymovými soupravami firmy Dialab (Viedeň, Rakousko), HDL-cholesterol přímou metodou firmy Human Diagnostics (Wiesbaden, SRN); koncentrace LDL-cholesterolu byla počítána podle Friedewaldovy formule. Pro stanovení Lp(a) byla použita imunoturbidimetrická metoda firmy Dako (Glostrup, Dánsko).

7.2.3. Stanovení ukazatelů nutrice a zánětu

Koncentrace albuminu byla stanovena fotometricky soupravou ALBUMIN liquicolor (Human Diagnostics, Wiesbaden, SRN). Koncentrace CRP, transferinu a prealbuminu byla stanovena imunoturbidimetricky; v případě CRP soupravou firmy K-Assay (Kamiya Biomedical Comp., Seattle, WA, USA), v dalších dvou případech soupravami firmy Roche (Mannheim, SRN) na analyzátoru Olympus AU 400.

7.2.4. Stanovení ukazatelů oxidačního stresu a antioxidační ochrany

Antioxidační enzymy SOD a GPx byly stanoveny pomocí souprav firmy Randox (Crumlin, UK), GSH fotometricky soupravou firmy Oxis (Portland, USA). MDA byl stanoven fotometricky jako TBARS. MDA a jiné degradační produkty peroxidace reagují s dvěma molekulami kyseliny thiobarbiturové v kyselém prostředí na barevný produkt, který se po extrakci n-butanolem měří při 532 nm použitím čtečky mikrodestiček AUTO-EIA II (Labsystems Oy, Espoo, Finsko). I přes nespecifitu této reakce bylo prokázáno, že většina

TBARS pochází z lipoperoxidace [Lefèvre *et al.*, 1998]. OxLDL byly stanoveny metodou ELISA (enzymová imunoanalýza) firmy Mercodia (Uppsala, Švédsko). AGE látky byly stanoveny fluorimetricky a jsou uváděny v arbitrárních (fluorescenčních) jednotkách (FU) a v přepočtu na gram proteinu (FU/g). AOPP byly stanoveny spektrofotometricky podle metodiky Witko-Sarsatové [Witko-Sarsat *et al.*, 1996] a jsou vyjádřeny v jednotkách chloraminu (mmol/l). Při stanovení AGE látek a AOPP jsme vycházeli z práce Kalousové *et al.* [Kalousová *et al.*, 2002].

7.2.5. Stanovení ukazatelů kalciofosfátového a kostního metabolismu

Koncentrace vápníku a anorganických fosfátů byly stanoveny fotometrickými testy firmy Olympus na analyzátoru Olympus AU 400, b-ALP chemiluminiscenční metodou firmy Beckman Coulter (Fullerton, USA) na přístroji Access 2, intaktní PTH pomocí metody LIA (typ imunoanalytické metody s luminometrickou detekcí) na automatickém immunoanalyzátoru Liason firmy Dia Sorin (Saluggia, Italy), OC metodou IRMA (typ imunoanalytické metody s detekcí radioaktivity) od firmy Cis Bio International (Lyon, Francie) a OPG metodou ELISA firmy Biomedica (Viedeň, Rakousko).

8. Výsledky

8.1. Změny koncentrace L-karnitinu

Průměrná koncentrace volného KAR (dále v textu bude užívána již pouze zkratka KAR) u zdravých dárců krve byla $40,1 \pm 8,9$ $\mu\text{mol/l}$, z toho u mužů $43,4 \pm 8,1$ $\mu\text{mol/l}$ a u žen $33,1 \pm 5,6$ $\mu\text{mol/l}$. U dialyzovaných byla tato hodnota $30,5 \pm 10,3$ $\mu\text{mol/l}$ před dialýzou ($p < 0,001$ pro rozdíl hodnot zdraví vs. nemocní před dialýzou; viz *Graf 1*) a $9,4 \pm 4,6$ $\mu\text{mol/l}$ po dialýze ($p < 0,001$ pro hodnoty před dialýzou a po ní). Rozdíl hodnot mezi dialyzovanými muži a ženami nebyl statisticky významný.

Obě podskupiny dialyzovaných, suplementovaní i nesuplementovaní, měly na začátku studie srovnatelné hladiny KAR v séru. Zatímco u suplementovaných hladina KAR měřeného před dialýzou po uplynutí 3 a 6 měsíců suplementace významně vzrostla (z $29,5 \pm 8,7 \mu\text{mol/l}$ na $135,3 \pm 39,9 \mu\text{mol/l}$ resp. $111,7 \pm 35,7 \mu\text{mol/l}$; $p < 0,001$), u nesuplementovaných měla tendenci spíše k mírnému poklesu (z $30,4 \pm 11,5 \mu\text{mol/l}$ na $30,2 \pm 12,5 \mu\text{mol/l}$ resp. $25,7 \pm 10,0 \mu\text{mol/l}$) (viz *Tab. 1* a *Graf 1*). Rozdíl v sérové koncentraci KAR mezi suplementovanými a nesuplementovanými pacienty byl potvrzen také na základě výsledků logistické regresní analýzy.

Koncentrace KAR byla sledována u suplementovaných pacientů ještě 2 měsíce po vysazení (tj. 7. a 8. měsíc po zahájení studie). Hladina se ustálila v průměru na $65 \mu\text{mol/l}$ (resp. $64,6 \pm 20,7 \mu\text{mol/l}$ a $65,0 \pm 16,6 \mu\text{mol/l}$; $p < 0,01$ vs. hodnoty před suplementací), viz *Tab. 1*.

Tab. 1. Srovnání sérových hladin volného L-karnitinu u skupiny suplementovaných hemodialyzovaných pacientů (KARNITIN) a skupiny hemodialyzovaných pacientů bez suplementace L-karnitinem (PLACEBO) v jednotlivých fázích studie. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka v $\mu\text{mol/l}$ vždy před dialýzou a po ní.

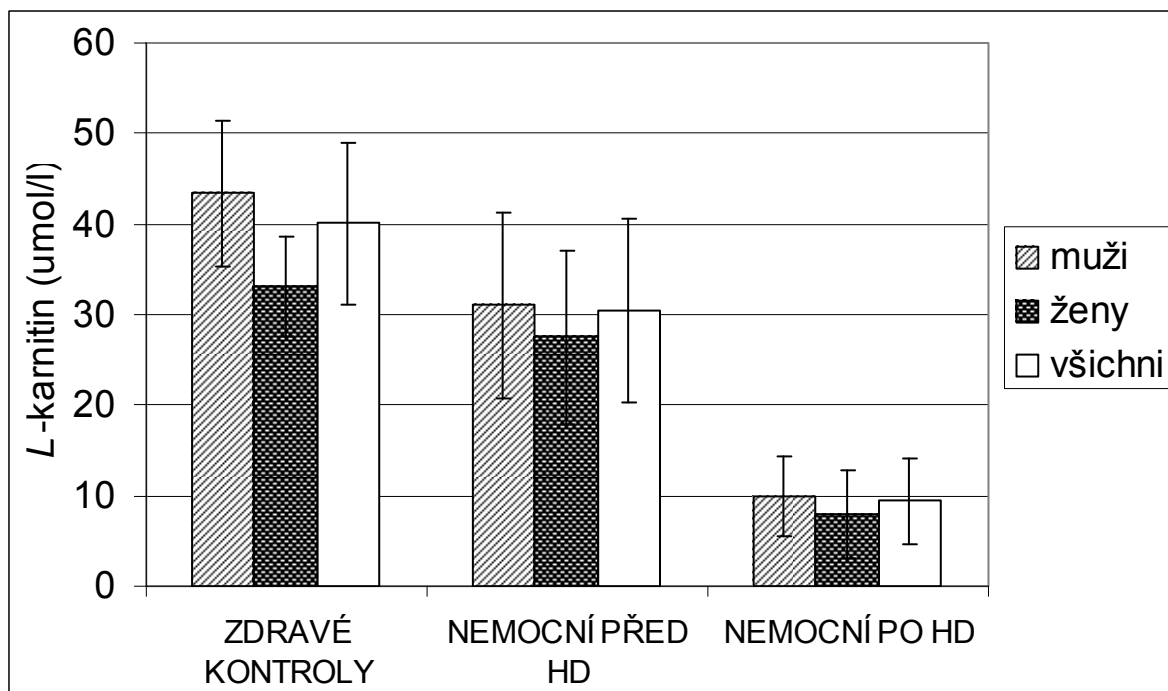
Skupina	Měsíc 0		Měsíc 3		Měsíc 6		Měsíc 7	Měsíc 8
	před HD	po HD	před HD	po HD	před HD	po HD	před HD	před HD
KARNITIN	$29,5 \pm 8,7$	$9,2 \pm 4,4$	$135,3 \pm 39,9$	$39,4 \pm 12,5$	$111,7 \pm 35,7$	$37,6 \pm 12,6$	$64,6 \pm 20,7$	$65,0 \pm 16,6$
PLACEBO	$30,4 \pm 11,5$	$9,7 \pm 5,0$	$30,2 \pm 12,5$	$10,8 \pm 5,8$	$25,7 \pm 10,0$	$11,1 \pm 3,8$	–	–

Vysvětlivky: HD – hemodialýza

Vzhledem k referenčním hodnotám pro KAR v séru, které uvádí Thomas ve své knize *Clinical Laboratory Diagnostics* [Thomas, 1998], mělo 26,5 % našich hemodialyzovaných

nemocných na začátku studie hodnoty před dialýzou snížené, zatímco 73,5 % nemocných mělo hodnoty v referenčním rozmezí. Vzhledem ke skupině dárců krve mělo přibližně 40 % našich pacientů hodnoty KAR srovnatelné s touto kontrolní skupinou, zatímco asi 60 % z nich mělo hodnoty nižší. V období po hemodialýze měli výrazně nižší hodnoty všichni nemocní (průměrně na 30 % hodnoty před dialýzou), což odpovídá již výše citované práci Goral [Goral, 2001].

Graf 1. Srovnání sérových hladin volného L-karnitinu u zdravých osob s hladinami u hemodialyzovaných nemocných během dialýzy (před HD a po HD).



Vysvětlivky: HD – hemodialýza

Zatímco u nesuplementovaných pacientů hladina KAR mírně klesala, u suplementovaných došlo k prudkému nárůstu, takže i hladiny po dialýze se dostaly nad dolní referenční mez pro zdravou populaci. Zajímavé je, že účinek suplementace byl dlouhodobý, vyšší hladina KAR se udržela i v období dvou měsíců po jejím ukončení.

8.2. Změny červeného krevního obrazu a dávek erythropoetinu

V tomto bloku jsme hodnotili koncentraci hemoglobinu (Hb) a týdenní dávky podávaného erythropoetinu (rHuEPO). Statistická deskripce těchto parametrů je uvedena v tabulce č. 2 (viz Tab. 2). Z důvodu nenormálního rozložení a velkého rozptylu hodnot jsou týdenní dávky rHuEPO uvedeny v mediánech.

Tab. 2. Hladiny hemoglobinu a týdenní dávka erythropoetinu v průběhu suplementace L-karnitinem u suplementované skupiny (KAR) a kontrolní skupiny, která užívala placebo (P). Hodnoty hemoglobinu jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka, týdenní dávky erythropoetinu jsou uvedeny v mediánech.

Parametr	Skupina	Měsíc 0	Měsíc 1	Měsíc 2	Měsíc 3	Měsíc 4	Měsíc 5	Měsíc 6
Hb (g/l)	KAR	113,32 ± 18,33	113,24 ± 17,03	114,22 ± 16,62	116,02 ± 16,88	112,70 ± 16,43	113,68 ± 16,45	114,84 ± 17,02
	P	115,15 ± 17,49	113,61 ± 18,12	116,41 ± 17,38	120,20 ± 15,69	113,12 ± 13,41	118,80 ± 15,93	117,05 ± 17,26
Dávka rHuEPO (U/týden)	KAR	3000	4000	4000	3500	3500	4500	4500
	P	2000	4000	4000	4500	4500	5000	4500

Vysvětlivky: Hb – hemoglobin, rHuEPO – rekombinantní lidský erythropoetin, U – jednotka

V průběhu studie jsme neprokázali statisticky významné změny v koncentraci Hb ani u jedné ze skupin. Neprokázali jsme ani změny v dávkování rHuEPO ve smyslu snižování dávek během léčby KAR tak, jak to bylo popisováno v některých výše citovaných pracích. Nebyl zaznamenán ani odlišný trend těchto parametrů mezi pacienty suplementovanými KAR a kontrolní skupinou, dostávající placebo.

8.3. Změny metabolismu lipidů

Statistická deskripce sledovaných ukazatelů lipidového metabolismu je shrnuta v tabulce č. 3 (viz Tab. 3).

Tab. 3. Ukazatele metabolismu lipidů během suplementace L-karnitinem u suplementované skupiny (KAR) a kontrolní skupiny, která užívala placebo (P). Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka.

Parametr	Skupina	Měsíc 0	Měsíc 3	Měsíc 6
TC (mmol/l)	KAR	4,61 ± 1,05	4,66 ± 1,02	4,62 ± 1,29
	P	4,57 ± 1,10	4,47 ± 0,98	4,43 ± 0,95
HDL-C (mmol/l)	KAR	1,04 ± 0,31	1,04 ± 0,32	1,06 ± 0,37
	P	1,13 ± 0,31	1,17 ± 0,37	1,14 ± 0,36
LDL-C (mmol/l)	KAR	2,68 ± 0,82	2,74 ± 0,76	2,69 ± 0,77
	P	2,65 ± 0,93	2,60 ± 0,77	2,56 ± 0,83
TAG (mmol/l)	KAR	2,43 ± 1,18	2,38 ± 1,76	2,32 ± 1,04
	P	1,89 ± 0,93	2,22 ± 1,19	1,99 ± 0,95
Lp (a) (g/l)	KAR	0,38 ± 0,54	0,47 ± 0,69	0,46 ± 0,69
	P	0,48 ± 0,59	0,52 ± 0,70	0,54 ± 0,66

Vysvětlivky: TC – celkový cholesterol, HDL-C – HDL-cholesterol, LDL-C – LDL-cholesterol, TAG – triacylglyceroly, Lp(a) – lipoprotein(a)

Vzhledem k tomu, že KAR je nezbytný pro správné fungování intramitochondriální beta-oxidace MK, předpokládali jsme, že bychom z měřených parametrů lipidového metabolismu jeho suplementací mohli ovlivnit zejména sérovou koncentraci TAG. U skupiny nemocných suplementovaných KAR měla triacylglycerolémie skutečně klesající tendenci, zatímco u placebové skupiny byl zaznamenán opačný trend. Tyto změny však nebyly statisticky významné.

Změny koncentrace ostatních lipidů, tj. celkového cholesterolu a jeho HDL a LDL frakcí ani Lp(a), nejevily statisticky významné změny ani jednoznačný trend u suplementované skupiny ani u kontrol.

8.4. Změny ukazatelů nutriční a zánětu

Statistická deskripce sledovaných ukazatelů stavu nutriční a zánětu je shrnuta v tabulce č. 4 (viz Tab. 4). Z důvodu nenormálního rozložení dat jsou hodnoty CRP uvedeny v mediánech (v závorce je uvedena minimální a maximální hodnota).

Tab. 4. Ukazatele stavu nutriční a zánětu během suplementace L-karnitinem u suplementované skupiny (KAR) a kontrolní skupiny, která užívala placebo (P). Hodnoty albuminu, prealbuminu a transferinu jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka, hodnoty C-reaktivního proteinu jsou uvedeny v mediánech (minimum–maximum).

Parametr	Skupina	Měsíc 0	Měsíc 1	Měsíc 2	Měsíc 3	Měsíc 4	Měsíc 5	Měsíc 6
Albumin (g/l)	KAR	39,05 ± 3,87	38,26 ± 3,33	38,41 ± 2,87	38,98 ± 2,75	38,72 ± 3,03	39,10 ± 3,32	41,32 ± 5,68
	P	38,69 ± 3,20	38,10 ± 3,37	38,85 ± 3,45	39,29 ± 3,03	39,15 ± 3,03	39,21 ± 2,75	40,53 ± 3,50
Prealbumin (g/l)	KAR	0,31 ± 0,10	–	–	0,35 ± 0,10	–	–	0,27 ± 0,09
	P	0,30 ± 0,10	–	–	0,33 ± 0,12	–	–	0,28 ± 0,11
Transferin (g/l)	KAR	1,72 ± 0,44	–	–	1,75 ± 0,40	–	–	1,45 ± 0,48
	P	1,68 ± 0,32	–	–	1,69 ± 0,28	–	–	1,43 ± 0,45
CRP (mg/l)	KAR	4,0 (1,0–75,0)	–	–	–	–	–	5,0 (1,0–160,0)
	P	4,0 (1,0–50,0)	–	–	–	–	–	5,0 (1,0–186,0)

Vysvětlivky: CRP – C-reaktivní protein

V průběhu studie jsme neprokázali statisticky významné změny v koncentraci albuminu, prealbuminu, transferinu a CRP ani u jedné ze sledovaných skupin. Nebyl zaznamenán ani odlišný trend těchto parametrů mezi pacienty suplementovanými KAR a kontrolní skupinou, dostávající placebo.

8.5. Ovlivnění oxidačního stresu a antioxidační ochrany

Hladiny sledovaných ukazatelů oxidačního stresu a antioxidační ochrany u hemodialyzovaných nemocných suplementovaných KAR ve srovnání s kontrolní skupinou, která užívala placebo, jsou uvedeny v tabulce č. 5 (viz Tab. 5). Výsledky jsou vyjádřeny v mediánech, jelikož většina dat nebyla normálně rozložena.

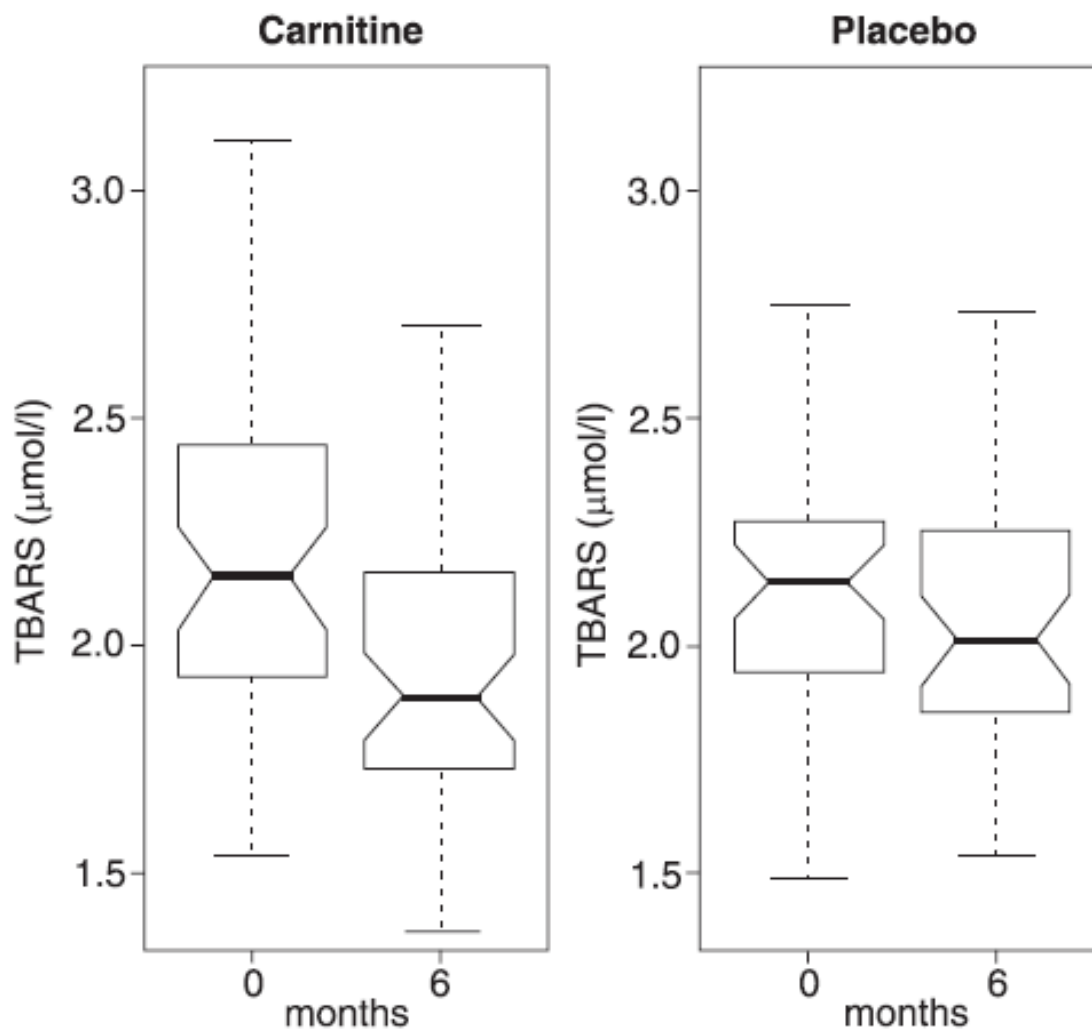
Tab. 5. Hladiny parametrů oxidačního stresu a antioxidační ochrany u hemodialyzovaných nemocných během suplementace L-karnitinem (KAR) a kontrolní skupiny, která užívala placebo (P). Data jsou uvedena v mediánech (minimum–maximum), p vyjadřuje statistickou významnost změny mezi hodnotou v měsíci 0 a hodnotou v měsíci 6 ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; NS – statisticky nevýznamná změna).*

Parametr	Skupina	Měsíc 0	Měsíc 6	P
SOD (U/g)	KAR	977,5 (489,0–1601,0)	1081,0 (743,0–1477,0)	*
	P	874,0 (488,0–1582,0)	1077,0 (688,0–1582,0)	*
GPx (U/g)	KAR	51,2 (24,2–82,4)	50,8 (21,4–105,7)	NS
	P	54,2 (27,2–75,7)	54,6 (28,3–80,2)	NS
GSH (mmol/l)	KAR	2,03 (1,35–82,40)	1,85 (0,93–2,67)	*
	P	2,06 (1,41–2,85)	1,87 (0,84–3,06)	*
MDA (TBARS) ($\mu\text{mol/l}$)	KAR	2,15 (1,12–5,58)	1,89 (1,37–8,21)	*
	P	2,14 (1,49–4,43)	2,01 (1,18–3,59)	NS
OxLDL (IU/l)	KAR	157,0 (64,0–299,1)	120,6 (53,0–359,0)	***
	P	144,3 (43,0–292,0)	98,0 (55,0–259,0)	*
AGE (RLU/g bílkoviny séra)	KAR	25,7 (14,1–44,6)	28,5 (17,3–43,5)	***
	P	25,9 (15,7–39,4)	27,3 (13,9–44,9)	***
AOPP ($\mu\text{mol/l}$)	KAR	101,5 (8,0–246,0)	94,0 (51,0–253,0)	NS
	P	83,0 (52,0–181,0)	85,0 (46,0–161,0)	NS

Vysvětlivky: SOD – superoxid-dismutáza, GPx – glutathionperoxidáza, GSH – redukovaný glutathion, MDA – malondialdehyd, TBARS – thiobarbituric acid-reactive substances (látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou), oxLDL – oxidované LDL částice, AGE – advanced glycation end-products (produkty pokročilé glykace), AOPP – advanced oxidation protein products (produkty pokročilé oxidace proteinů)

Počáteční hodnoty měřených parametrů se statisticky významně nelišily mezi oběma skupinami pacientů. Přestože došlo k některým signifikantním změnám během půlroční suplementační periody, většinou se tyto změny udály v obou sledovaných skupinách. Obě skupiny se tedy významně nelišily v dynamice změn antioxidačních enzymů SOD a GPx, GSH v erythrocytech, AGE látek ani AOPP. Koncentrace MDA (resp. TBARS) poklesla u suplementované skupiny ($p < 0,05$), zatímco u kontrolní skupiny nebyl pokles statisticky významný (viz *Graf 2*). Koncentrace oxLDL poklesla signifikantně v obou skupinách, ale v pokusné skupině byl rozdíl na vyšší hladině významnosti ($p < 0,001$) než v kontrolní skupině ($p < 0,05$).

Graf 2. Základní koncentrace malondialdehydu (resp. TBARS) a efekt šestiměsíční suplementace L-karnitinem u suplementované skupiny (Carnitine) a kontrolní skupiny (Placebo). Data jsou znázorněna jako box-plot grafy, horizontální linie představují medián, 25. a 75. percentil, minimum a maximum.



Vysvětlivky: TBARS – thiobarbituric acid-reactive substances (látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou)

8.6. Vliv na kalciofosfátový a kostní metabolismus

Hladiny sledovaných ukazatelů kalciofosfátového metabolismu a kostní přestavby u hemodialyzovaných nemocných suplementovaných KAR ve srovnání s kontrolní skupinou, která užívala placebo, jsou uvedeny v tabulce č. 6 (viz Tab. 6). Výsledky jsou vyjádřeny v mediánech, jelikož data nebyla normálně rozložena.

Tab. 6. Hladiny parametrů kalciofosfátového metabolismu a kostní přestavby u hemodialyzovaných nemocných během suplementace L-karnitinem (KAR) a kontrolní skupiny, která užívala placebo (P). Data jsou uvedena v mediánech (minimum–maximum), p vyjadřuje statistickou významnost změny mezi hodnotou v měsíci 0 a hodnotou v měsíci 6 ($p < 0,05$; NS – statisticky nevýznamná změna).*

Parametr	Skupina	Měsíc 0	Měsíc 3	Měsíc 6	P
Ca (mmol/l)	KAR	2,30 (1,65–2,97)	2,28 (1,52–2,78)	2,32 (1,87–3,18)	NS
	P	2,35 (1,91–2,85)	2,37 (2,03–3,12)	2,36 (2,03–2,80)	NS
P (mmol/l)	KAR	1,74 (0,71–3,71)	1,86 (0,94–3,43)	1,76 (0,57–3,30)	NS
	P	1,71 (1,02–3,50)	2,11 (1,10–3,63)	1,84 (0,69–4,30)	NS
Ca x P (mmol ² /l ²)	KAR	4,08 (1,55–7,26)	4,35 (2,14–8,12)	4,22 (1,52–7,59)	NS
	P	4,14 (2,42–8,68)	4,70 (2,35–8,86)	4,15 (1,51–8,99)	NS
PTH (ng/l)	KAR	186,0 (12,0–646,0)	–	135,5 (11,0–627,0)	NS
	P	148,0 (10,0–1294,0)	–	207,0 (10,0–685,0)	NS
b-ALP (μg/l)	KAR	13,9 (4,8–80,3)	–	13,2 (4,4–51,7)	*
	P	15,2 (5,8–47,8)	–	13,2 (5,4–49,3)	*
OC (μg/l)	KAR	78,3 (19,8–259,2)	–	68,8 (6,5–381,9)	NS
	P	62,7 (16,6–409,1)	–	79,8 (20,7–408,2)	*
OPG (ng/l)	KAR	144,0 (56,0–388,0)	–	182,0 (56,0–450,0)	*
	P	140,0 (48,0–448,0)	–	164,0 (48,0–460,0)	NS

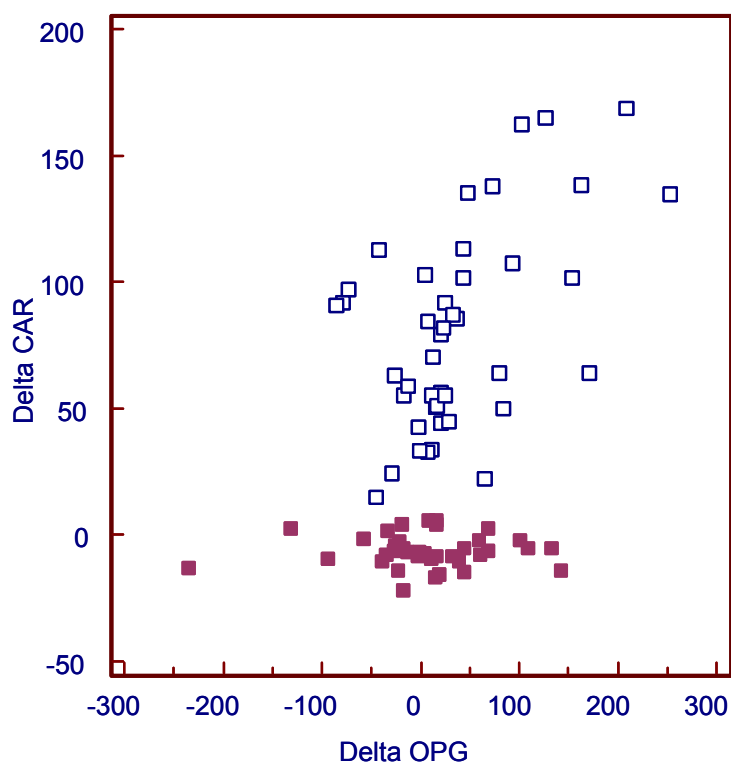
Vysvětlivky: Ca – vápník celkový, P – anorganické fosfáty, Ca x P – kalciofosfátový součin, PTH – parathormon, b-ALP – kostní izoenzym alkalické fosfatázy, OC – osteokalcin, OPG – osteoprotegerin

Statistické zpracování dat metodou vícečetné logistické regresní analýzy ukázalo, že pouze sérová koncentrace KAR byla proměnnou, která se statisticky významně lišila mezi pokusnou a kontrolní skupinou. Obě skupiny se nelišily v koncentracích vápníku, fosfátů, ani ve výpočtu kalciofosfátového součinu. Hodnoty těchto parametrů oscilovaly (byly sledovány v měsíčních intervalech), nebylo proto možné vysledovat jakýkoliv trend. V případě PTH jevila jeho koncentrace u suplementované skupiny klesající tendenci na rozdíl od tendence k nárůstu u kontrolní skupiny. Nicméně tyto změny nebyly statisticky významné pro široký rozptyl koncentrací PTH mezi jednotlivými pacienty. Nenalezli jsme žádné změny v dynamice b-ALP v porovnání obou sledovaných skupin nemocných. Sice jsme pozorovali významný pokles koncentrace b-ALP během suplementace KAR, ten se však objevil u obou skupin současně, takže nemůže být přikládán účinkům KAR. Změny b-ALP a OC by mohly být charakterizovány jako pokles kostního obratu u nemocných suplementovaných KAR, i když pokles OC zde nebyl statisticky významný.

Fyziologická koncentrace OPG v séru zdravých osob je 18–42 ng/l. Naši nemocní měli na počátku studie koncentraci OPG $172,0 \pm 91,4$ ng/l (medián = 142,0). Následkem suplementace KAR jeho koncentrace dále rostla ($p < 0,05$), zatímco u kontrol byl vzestup menší a jen nevýznamný. Protože OPG je znám jako faktor inhibující aktivaci osteoklastů, jeho vzestup může mít pozitivní účinek v prevenci renální osteodystrofie a osteoporózy. Tyto závěry podporuje i zjištěná statisticky významná pozitivní korelace mezi změnou koncentrace KAR a změnou koncentrace OPG u skupiny našich nemocných suplementovaných KAR (viz *Graf 3*). Změna koncentrace KAR se také jevila jako nejvýznamnější ukazatel změny

koncentrace OPG v modelu mnohočetné regrese. Druhým, méně významným faktorem byla změna koncentrace PTH (viz Tab. 7).

Graf 3. Pořadová korelace mezi změnou koncentrace osteoprotegerinu (Delta OPG v ng/l) a karnitinu (Delta CAR v $\mu\text{mol/l}$). Statisticky významná korelace ($r = 0,46$; $p = 0,003$) byla nalezena u skupiny suplementovaných L-karnitinem (prázdné čtverce), žádná korelace nebyla prokázána u kontrol s placebem (plné čtverce).



Tab. 7. Významné faktory určující změnu koncentrace osteoprotegerinu u skupiny hemodialyzovaných nemocných suplementovaných L-karnitinem

Nezávislé proměnné	regresní koeficient	SE	P
změna KAR	0,76673	0,24715	0,0035
změna PTH	0,1673	0,07933	0,0413
věk	1,82	0,73	0,02
R ² adjusted = 0,38 (p<0,001)			

Vysvětlivky: KAR – karnitin, PTH – parathormon, SE – standard error (standardní chyba), p – statistická významnost, R² adjusted – adjustovaný regresní koeficient

8.7. Změny klinického stavu

Suplementace KAR nebyla doprovázena žádnými nežádoucími účinky. Nikdo z pacientů neodstoupil ze studie na základě jakýchkoli negativních subjektivních příznaků. Nemocní, kteří nedokončili studii z důvodu úmrtí, pocházeli jak ze suplementované skupiny (7 nemocných), tak z kontrolní skupiny (9 nemocných).

Na druhé straně nebyl zjištěn rozdíl v subjektivním vnímání stavu nemocných ani v komplikacích hemodialýzy (jako je např. výskyt hypotenze, křečí, arytmií aj.) mezi suplementovanou a kontrolní skupinou.

9. Diskuze

Někteří autoři popisují, že následkem suplementace KAR u hemodialyzovaných nemocných může dojít k pozitivnímu ovlivnění stavu nutrice. Tak např. Argani et al. pozorovali po každodenním perorálním podávání 500 mg KAR po dobu 2 měsíců zvýšení koncentrace albuminu z $37,0 \pm 4,0$ na $42,0 \pm 5,0$ g/l [Argani *et al.*, 2005]. Savica et al.

podávali KAR intravenózně v dávce 20 mg/kg (n = 48) nebo placebo (n = 65) třikrát týdně na konci každé dialýzy po dobu 6 měsíců. Skupina nemocných suplementovaná KAR vykázala vzestup sérového albuminu, tranferinu, hemoglobinu a BMI, a zároveň také statisticky významný pokles koncentrace CRP. U kontrolní skupiny albumin, transferin a BMI dokonce poklesly [Savica *et al.*, 2005]. Autoři vysvětlují pozorované změny protizánětlivým účinkem KAR a zlepšením energetického metabolismu po jeho suplementaci.

Na rozdíl od výše popsaných studií v našem souboru nemocných se účinek KAR na parametry nutriční neprojevil. Jestliže posuzujeme koncentraci ukazatelů nutriční před zahájením suplementace KAR, zdá se, že jen velmi malé procento osob trpělo skutečnou proteinovou malnutricí. Konkrétně pouze 8,7 % zařazených pacientů mělo před zahájením studie koncentraci prealbuminu nižší než dolní referenční mez (< 0,2 g/l); v případě albuminu to bylo 10,9 % pacientů (< 35 g/l). Nižší hladina transferinu (< 2,0 g/l) byla před studií v plných 73,9 % případů, avšak tento ukazatel je ovlivňován metabolismem železa. Podle hladiny prealbuminu a albuminu se tedy zdá, že většina nemocných netrpěla proteinovou malnutricí, a možná právě proto se efekt KAR nemohl projevit.

V řadě prací je popisován efekt KAR na červený krevní obraz a na snížení potřeby rHuEPO u hemodialyzovaných nemocných [Boran *et al.*, 1996; Bérard & Iordache, 1992]. Tento efekt je zprostředkován pravděpodobně zvýšením stability erytrocytární membrány a tedy nižším stupněm hemolýzy [Arduini *et al.*, 1990; Bérard *et al.*, 1994]. V naší studii se tento efekt, na rozdíl od pilotní studie [Veselá *et al.*, 2001], neprojevil. Příčinu této diskrepance nedovodíme vysvětlit.

Co se týká vlivu KAR na lipidový metabolismus, zde jsme předpokládali, že následkem suplementace dojde u hemodialyzovaných nemocných ke zlepšení intramitochondriální beta-oxidace. To se mělo projevit zejména poklesem hladiny TAG. Zároveň naše hypotéza byla založena na předpokladu, že odstraňování nadbytečných MK

z cytosolu buněk a celkové zefektivnění energetického metabolismu povede ke zmírnění oxidačního stresu. Deficit KAR a vyšší míra oxidačního stresu u hemodialyzovaných nemocných byly dobrým předpokladem pro validitu této hypotézy, stejně jako výsledky pilotní studie Veselá *et al.* Tehdy se podával KAR intravenózně 12 hemodialyzovaným nemocným po stejnou dobu a ve stejné dávce jako nyní, a došlo k signifikantnímu poklesu MDA (resp. TBARS) a normalizaci lipidogramu [Veselá *et al.*, 2001]. Někteří jiní autoři rovněž připisují KAR výrazné antioxidační účinky [Ames & Liu, 2004; Sener *et al.*, 2004]. Rozdílný trend v koncentraci sérových TAG mezi pokusnou a kontrolní skupinou a zároveň signifikantní pokles MDA (resp. TBARS) u nemocných suplementovaných KAR ve srovnání s placebem podporují naši hypotézu, přestože změny ostatních parametrů lipidového metabolismu, oxidačního stresu a antioxidační ochrany nebyly tak markantní, jak jsme původně předpokládali.

Také v případě kalciofosfátového metabolismu jsme byli překvapeni relativně dobrým stavem sledované populace našich dialyzovaných nemocných již před zahájením suplementace KAR. Sérové hladiny vápníku, fosfátů, kalciofosfátový součin ani PTH se významně neodchylovaly od doporučených hodnot pro osoby s různým stádiem renálního selhání podle National Kidney Foundation [National Kidney Foundation, 2003]. Předpokládali jsme, že chronicky hemodialyzovaní nemocní budou trpět hyperfosfatémií, jak je to popisováno v literatuře [Giachelli *et al.*, 2005]. Naše hypotéza byla založena na potencionálním snížení fosfatémie následkem zlepšeného energetického metabolismu buněk po podávání KAR. Nadbytečný fosfor měl být využit pro různé intracelulární fosforylační reakce, včetně syntézy ATP. Tato hypotéza byla podpořená i některými jinými studiemi, kdy po podávání KAR u dialyzovaných nemocných k poklesu fosfatémie skutečně došlo [Ahmad *et al.*, 1990; Veselá *et al.*, 2001]. Tyto studie však byly prováděny u relativně výrazně hyperfosfatémických pacientů, což může být jednou z příčin našeho negativního výsledku.

Ačkoli jsme neprokázali signifikantní rozdíly v koncentraci vápníku, fosfátů ani kalciofosfátového součinu, v hodnotách PTH byl znatelně odlišný trend mezi pokusnou a kontrolní skupinou. Tento rozdíl nedovedeme přesně vysvětlit, nicméně je možné spekulovat o přímém účinku KAR na příštítná tělíska. Tato možná vzájemná souvislost není v odborné literatuře dosud popsána a mohla by být předmětem dalšího výzkumu.

Jelikož oxidace MK poskytuje značnou část energie pro výživu kostní tkáně [Adamek *et al.*, 1987], sledovali jsme rovněž vliv suplementace KAR na metabolismus osteoblastů. Hladiny b-ALP a OC jsme hodnotili zejména jako ukazatele kostní přestavby. Přestože je koncentrace OC u osob s renálním selháním zvýšená mimojiné i v důsledku jeho porušeného vylučování ledvinami, je považován mnohými autory za velmi dobrý marker kostního obratu [Charhon *et al.*, 1986; Sebert *et al.*, 1987]. Na začátku studie mělo 91,7 % nemocných hodnoty zvýšené nad referenční meze určené v naší laboratoři [Cibulka *et al.*, 2007], zatímco jen 8,3 % nemocných mělo koncentraci OC normální. Průměrná hladina b-ALP byla rovněž na horní hranici normy [Ureña & De Vernejoul, 1999]. Z těchto nálezů usuzujeme na zvýšený kostní obrat u většiny pacientů před zahájením suplementace KAR. Změny b-ALP a OC ve spojení se změnami PTH u dialyzovaných nemocných suplementovaných KAR můžeme popsat jako tendenci k poklesu kostního obratu a sekundárního hyperparathyreoidismu.

Osa OPG/RANKL/RANK velmi zásadním způsobem ovlivňuje kostní přestavbu [Khosla, 2001; Kostenuik, 2005]. RANK (*receptor activator of nuclear factor NF- κ B*) je receptor nacházející se na prekurzorech osteoklastů, stejně jako na zralých osteoklastech. RANKL (ligand pro RANK – *receptor activator of nuclear factor NF- κ B-ligand*) je aktivátor, který se váže na RANK. Při vazbě RANKL na RANK dochází k diferenciaci a aktivaci osteoklastů a následnému zvýšení kostní resorpce. OPG je peptid, který je produkován osteoblasty, kompetitivně se váže s RANKL a inhibuje tak aktivaci osteoklastů. Nakashima *et al.* prokázali významnou pozitivní korelaci mezi plazmatickou koncentrací OPG a kostní

denzitou u hemodialyzovaných nemocných [Nakashima *et al.*, 2006]. OPG můžeme považovat za protektivní faktor rozvoje renální osteodystrofie a osteoporózy. U pacientů na dialýze se vyskytují zvýšené hladiny OPG, pravděpodobně se jedná o kompenzační mechanismus, který brání zvýšené ztrátě kostní hmoty, která zde nastává v důsledku sekundárního hyperparathyreoidismu [Avbersek-Luznik *et al.*, 2002].

Významné změny v koncentraci OPG byly pozorovány v naší studii po šestiměsíční suplementaci KAR. Zatímco došlo ke statisticky významnému vzestupu OPG u suplementovaných pacientů, u kontrol došlo pouze k nevýznamné změně. Tento nálezný mohl být částečně vysvětlen opačným trendem v koncentraci PTH, neboť je prokázáno, že PTH je faktor, který významně snižuje poměr OPG/RANKL. Lee a Lorenzo popsali, že PTH snižuje expresi OPG v osteoblastech [Lee & Lorenzo, 1999]. Výsledky mnohočetné regrese však ukázaly, že nejsilnějším prediktorem změny koncentrace OPG byla změna sérové koncentrace KAR. Tyto výsledky naznačují, že by suplementace KAR skutečně mohla ovlivňovat metabolismus kostní tkáně se zvýšením aktivity osteoblastů. Výzkumný tým Colucciho *et al.* došli v *in vitro* studii k podobným závěrům [Colucci *et al.*, 2005].

10. Závěry a doporučení

Jelikož je KAR nezbytný pro správný chod metabolismu a jeho nedostatek, který byl opakovaně prokázán u hemodialyzovaných nemocných, se může podílet na vzniku závažných komplikací dialyzační léčby, je mnohými autory doporučováno přistoupit u této skupiny pacientů k jeho suplementaci. Podle našich výsledků má však poměrně značná část hemodialyzovaných nemocných hladinu KAR srovnatelnou se zdravou populací. Efekt suplementace u těchto jedinců je tedy poněkud sporný, i když jsme si vědomi skutečnosti, že sérová hladina nemusí zcela dobře odrážet tkáňovou saturaci. Naopak se dají předpokládat příznivé účinky suplementace u pacientů s prokázaným deficitem KAR, který byl doposud

hodnocen jen podle klinických příznaků. Také proto jsme zavedli metodu stanovení KAR na automatický analyzátor Olympus AU 400. Laboratorní stanovení tak může doplnit klinické příznaky nedostatku KAR a přispět k přesnějšímu výběru pacientů s deficitem KAR. Metoda je ve srovnání s ruční metodou rychlejší, přesnější, levnější a méně pracná. Navíc se ukázala být velice citlivou i při nízkých koncentracích KAR, čehož by se dalo využít právě u hemodialyzovaných nemocných, a to zejména po dialýze, kde se vyskytují výrazně snížené hodnoty volného KAR.

Na základě změn sledovaných parametrů, které jsme pozorovali během naší studie, jsme došli k následujícím závěrům:

1. Koncentrace volného karnitinu v séru u chronicky dialyzovaných nemocných před hemodialýzou je snížena jen asi u 40 % nemocných; zbývajících 60 % má koncentraci srovnatelnou s osobami s normální funkcí ledvin.
2. V průběhu hemodialýzy dochází k poklesu hladiny volného karnitinu; po výkonu dosahuje jeho koncentrace jen asi 30 % predialyzačních hodnot.
3. Suplementace L-karnitinem vede k významnému zvýšení koncentrace volného karnitinu v séru, takže i po hemodialýze obvykle přesahuje dolní referenční mez pro zdravou populaci.
4. Zvýšená koncentrace karnitinu v séru dlouhodobě přetrvává i po jeho vysazení; minimálně další 2 měsíce.
5. Suplementace L-karnitinem vede k poklesu koncentrace triacylglycerolů a snížení oxidačního stresu, což se projeví snížením plazmatické koncentrace produktu lipoperoxidace malondialdehydu a oxidovaných LDL částic. Protože hemodialyzovaní nemocní vykazují zvýšenou produkci volných radikálů a mají sníženou intracelulární antioxidační ochranu, mohl by být tento účinek karnitinu poměrně významný.
6. Suplementace L-karnitinem tlumí aktivaci osteoklastů (zvýšením produkce tkáňového inhibitoru osteoklastogeneze osteoprotegerinu) a vede ke snížení kostního obrátu a hladiny

parathormonu. Tento nále z se jeví jako významný metabolický účinek, neboť sekundární hyperparathyreóza se považuje za jeden z nepříznivých metabolických faktorů doprovázejících dialyzační léčbu.

7. Nezaznamenali jsme zlepšení stavu nutrice a zánětu ani ovlivnění červeného krevního obrazu. Tento nále z vysvětlujeme tím, že parametry nutrice i koncentrace hemoglobinu nevykazovaly významně snížené hodnoty u většiny nemocných ani před zahájením suplementace karnitinem.

8. Suplementace L-karnitinem nebyla doprovázena žádnými nežádoucími účinky; na druhé straně nebyl zjištěn rozdíl v subjektivním vnímání stavu nemocných ani v komplikacích hemodialýzy, jako je výskyt hypotenze, křečí a arytmií, mezi suplementovanými a kontrolní skupinou.

9. Suplementace L-karnitinem tedy může ovlivnit některé metabolické odchylky, které se vyskytují v souvislosti s jeho deficitem u hemodialyzovaných nemocných, zejména u osob s jeho významnějším deficitem.

10. Doposud se pro diagnostiku deficitu karnitinu používala jen klinická kritéria, která nelze podle našeho názoru považovat za zcela objektivní. Pro určení vhodných pacientů, u kterých by měl být karnitin léčebně podáván, proto nabízíme modifikovanou fotometrickou metodu pro stanovení volného karnitinu, kterou jsme adaptovali pro použití na automatický biochemický analyzátor Olympus AU 400.

Zdroje podpory

Tato práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR č. NB/7350-3 a výzkumným záměrem MSM č. 0021620819.

Anotace

Chronic kidney failure is associated with many kinds of metabolic disorders caused by the kidney disease and also attributable to dialysis treatment. Phenomena such as accumulation or deficit of various substances and dysregulation of metabolic pathways participate in the pathogenesis of these changes.

One of these disorders, which we studied in more detail, is a deficit of carnitine. Carnitine is a substance which plays an essential role in beta-oxidation of fatty acids by catalyzing their transport into the mitochondrial matrix. It enables obtaining of energy, namely in muscle cells including myocardium.

Patients with chronic kidney failure treated by hemodialysis are known to have decreased carnitine concentration in plasma and tissues due to its impaired synthesis in kidneys and the great loss across the hemodialysis membrane during dialysis sessions. A single hemodialysis session reduces plasma free-carnitine concentrations to about one-third of their predialysis values because of small molecule of free-carnitine. On the other hand, renal elimination of acylcarnitine, which is physiologically ineffective, may be impaired in chronic kidney failure, leading to increased blood concentrations of acylcarnitine. Although these subnormal free-carnitine levels with elevated acylcarnitine fractions may result in normal or elevated total plasma carnitine levels in dialysis patients, the functional carnitine pool in tissues is decreased.

Considerable evidence suggests that carnitine deficiency and abnormalities of carnitine metabolism result in a number of clinical conditions that are associated with dialysis, including muscle weakness, hypotension, fatigue, muscle cramps, poor exercise tolerance, anemia, left ventricular dysfunction, and higher incidence of arrhythmias. Recent studies have demonstrated that carnitine supplementation can restore the abnormal metabolism in dialysis patients and may alleviate some of the symptoms mentioned above.

The American National Kidney Foundation has recently approved “Practice Recommendations for the Use of L-carnitine in Dialysis-Related Carnitine Disorder”, which manifests itself as a syndrome of clinical problems and symptoms, most notable of which are anemia that is hyporesponsive to erythropoietin therapy, intradialytic hypotension, cardiomyopathy, and skeletal muscle dysfunction manifested as generalized fatigability.

The main goal of this project was to investigate possible effects of carnitine supplementation on metabolic parameters which could be positively influenced by the support of intramitochondrial beta-oxidation and energy metabolism. These are markers of nutrition, lipid metabolism, red blood cell count and, according to our previous findings, also parameters of oxidative stress and calcium-phosphate metabolism. The purpose is finding ways to prevent from the development of atherosclerosis and renal bone disease in chronically hemodialyzed patients.

The consequential goal was to adapt an enzymatic photometric method for free-carnitine determination and its automation for the Olympus AU 400 analyzer.

According to our results, a great deal of hemodialyzed patients has carnitine levels comparable with a healthy population. Hence, an effect of supplementation in these persons is questionable, although we realize that serum carnitine concentration may not accurately predicate of tissue saturation. Conversely, positive effects could be expected in patients with decreased carnitine levels.

Some authors describe that the supplementation with carnitine may positively influence nutritional-inflammation status of hemodialyzed patients. Changes should be happened due to anti-inflammatory effect of carnitine and general improvement of the energy metabolism after its administration. Furthermore, many papers describe positive effects of carnitine on the red blood cell count which manifest by reducing doses of erythropoietin in hemodialyzed patients treated for anemia. This influence should be enabled by increased

stability of the erythrocyte membrane and thus reduced degree of hemolysis. In contrast to our pilot study, these effects were not proved in the current study. We cannot identify causes so exactly, but it seems that a health state of the majority of patients was fairly well-managed at the beginning of the supplementation period and therefore an effect of carnitine on this field of metabolism could not have enforced.

With respect to potential effects of carnitine on lipid metabolism and oxidative stress, we noted a decreasing tendency of serum triglycerides levels in supplemented patients in contrast to controls. Concentration of malondialdehyde, which is considered to be a marker of oxidative stress, decreased. Other parameters of lipide metabolism, oxidative stress and antioxidative defense did not significantly differ between both groups of patients.

Although we did not prove any significant changes in concentrations of calcium and inorganic phosphate, we did find a tendency to correction of secondary hyperparathyroidism and reduction of bone turnover in the group of patients supplemented with carnitine along with an increasing tendency in controls. Concentration of osteoprotegerin increased significantly after six months of the supplementation, while levels of parathormone and osteocalcin had only a decreasing tendency which was not statistically significant. An opposite trend was noted in the control group without carnitine supplementation. As osteoprotegerin is an important factor which suppress activation of osteoclasts, its increased concentration might play a role in prevention of renal bone disease and osteoporosis in hemodialyzed patients.

In conclusion, the carnitine supplementation can influence some clinical and biochemical symptoms which occur in connection with its deficit in hemodialyzed patients. Concerning metabolis parameters, these are namely markers of nutrition and inflammation, lipid metabolism, red blood cell count and, according to our previous experience, also some parameters of oxidative stress and calcium-phosphate metabolism.

However, our results have shown that a great deal of hemodialyzed patients may have serum carnitine levels in reference ranges for healthy population. We can explain in this way, why observed metabolic changes were greater in our pilot study. At that time, from about 50 hemodialyzed patients were taken into the study only 12 patients with the lowest carnitine levels.

To date, the deficit of carnitine in hemodialyzed patients has been diagnosed only on the basis of clinical symptoms defined by the American Kidney Foundation. These symptoms are very important, but cannot serve as exact and objective evidence of carnitine deficiency. Therefore we developed the photometric method for free-carnitine determination which we modified and adapted for use on the Olympus AU 400 analyzer. This method may be helpful for selection of appropriate patients for carnitine supplementation.

Literatura

- Adamek G, Felix R, Guenther HL, Fleisch H: **Fatty acid oxidation in bone tissue and bone cells in culture. Characterization and hormonal influences.** *Biochem J* 1987, 248:129-137.
- Ahmad S, Robertson HT, Golper TA, Wolfson M, Kurtin P, Katz LA, Hirschberg R, Nicora R, Ashbrook DW, Kopple JD: **Multicenter trial of L-carnitine in maintenance hemodialysis patients. II. Clinical and biochemical effects.** *Kidney Int* 1990, 38:912-918.
- Alvestrand A: **Carbohydrate and insulin metabolism in renal failure.** *Kidney Int Suppl* 1997, 62:S48-52.
- Ames BN, Liu J: **Delaying the mitochondrial decay of aging with acetylcarnitine.** *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1033:108-116.
- Arduini A, Rossi M, Mancinelli G, Belfiglio M, Scurti R, Radatti G, Shohet SB: **Effect of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on the human erythrocyte membrane stability and deformability.** *Life Sci* 1990, 47:2395-2400.
- Argani H, Rahbaninoubar M, Ghorbanihagjo A, Golmohammadi Z, Rashtchizadeh N: **Effect of L-carnitine on the serum lipoproteins and HDL-C subclasses in hemodialysis patients.** *Nephron Clin Pract* 2005, 101:c174-9.
- Avbersek-Luznik I, Malesic I, Rus I, Marc J: **Increased levels of osteoprotegerin in hemodialysis patients.** *Clin Chem Lab Med* 2002, 40:1019-1023.
- Bellinghieri G, Santoro D, Calvani M, Mallamace A, Savica V: **Carnitine and hemodialysis.** *Am J Kidney Dis* 2003, 41:S116-22.
- Bellinghieri G, Savica V, Mallamace A, Di Stefano C, Consolo F, Spagnoli LG, Villaschi S, Palmieri G, Corsi M, Maccari F: **Correlation between increased serum and tissue L-carnitine levels and improved muscle symptoms in hemodialyzed patients.** *Am J Clin Nutr* 1983, 38:523-531.
- Bohmer T, Bergrem H, Eiklid K: **Carnitine deficiency induced during intermittent haemodialysis for renal failure.** *Lancet* 1978, 1:126-128.
- Boran M, Dalva I, Gönenç F, Cetin S: **Response to recombinant human erythropoietin (r-Hu EPO) and L-carnitine combination in patients with anemia of end-stage renal disease.** *Nephron* 1996, 73:314-315.
- Bremer J: **Carnitine-metabolism and functions.** *Physiol Rev* 1983, 63:1420-1480.
- Breningstall GN: **Carnitine deficiency syndromes.** *Pediatr Neurol* 1990, 6:75-81.

- Bérard E, Barrillon D, Iordache A, Bayle J, Cassuto-Viguier E: **Low dose of L-carnitine impairs membrane fragility of erythrocytes in hemodialysis patients.** *Nephron* 1994, 68:145.
- Bérard E, Iordache A: **Effect of low doses of L-carnitine on the response to recombinant human erythropoietin in hemodialyzed children: about two cases.** *Nephron* 1992, 62:368-369.
- Ceriello A: **New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy.** *Diabetes Care* 2003, 26:1589-1596.
- Charhon SA, Delmas PD, Malaval L, Chavassieux PM, Arlot M, Chapuy MC, Meunier PJ: **Serum bone Gla-protein in renal osteodystrophy: comparison with bone histomorphometry.** *J Clin Endocrinol Metab* 1986, 63:892-897.
- Cibulka R: **Metabolické účinky karnitinu a jeho význam v medicíně.** *Klin Biochem Metab* 2005, 13(34):24-28.
- Cibulka R, Racek J: **Metabolic disorders in patients with chronic kidney failure.** *Physiol Res* 2007; Epub ahead of print.
- Cibulka R, Racek J, Pikner R, Rajdl D, Trefil L, Veselá E, Studenovská M, Široká R: **Effect of L-carnitine supplementation on secondary hyperparathyroidism and bone metabolism in hemodialyzed patients.** *Calcif Tissue Int* 2007; Epub ahead of print.
- Cibulka R, Racek J, Veselá E: **Význam L-karnitinu u pacientů s chronickým renálním selháním léčených hemodialýzou.** *Vnitr Lek* 2005, 51:1108-1113.
- Cibulka R, Široká R, Trefil L, Racek J, Veselá E: **Measurement of carnitine in hemodialysis patients - adaptation of an enzymatic photometric method for an automatic analyzer.** *Clin Chem Lab Med* 2006, 44:983-986.
- Colucci S, Mori G, Vaira S, Brunetti G, Greco G, Mancini L, Simone GM, Sardelli F, Koverech A, Zallone A, Grano M: **L-carnitine and isovaleryl L-carnitine fumarate positively affect human osteoblast proliferation and differentiation in vitro.** *Calcif Tissue Int* 2005, 76:458-465.
- Dayal S, Lentz SR: **ADMA and hyperhomocysteinemia.** *Vasc Med* 2005, 10(Suppl 1):S27-33.
- De Felice SL, Lyons P, Caffar M C: **U.S.-Italy L-carnitine hemodialysis utilization survey.** *Dial Transplant* 1996, 25:368-373.
- Deicher R, Hörnl WH: **Hepcidin: a molecular link between inflammation and anaemia.** *Nephrol Dial Transplant* 2004, 19:521-524.

- Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, Vollenweider P, Pedrazzini T, Nicod P, Thorens B, Scherrer U: **Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase.** *Circulation* 2001, 104:342-345.
- Durak I, Akyol O, Başeşme E, Canbolat O, Kavutçu M: **Reduced erythrocyte defense mechanisms against free radical toxicity in patients with chronic renal failure.** *Nephron* 1994, 66:76-80.
- Eiselt J, Racek J, Opatrný K Jr: **Free radicals and extracorporeal renal replacement therapy.** *Vnitr Lek* 1999, 45:319-324.
- Eknoyan G, Latos L, Lindberg J: **Practice recommendations for the use of L-carnitine in dialysis-related carnitine disorder.** *Am J Kidney Dis* 2003, 41:868-876.
- Eschbach JW, Adamson JW: **Anemia of end-stage renal disease (ESRD).** *Kidney Int* 1985, 28:1-5.
- Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Brandi L, Bevilacqua S: **Insulin resistance in essential hypertension.** *N Engl J Med* 1987, 317:350-357.
- Friedmann S, Fraenkel G: **Reversible enzymatic acetylation of carnitine.** *Arch Biochem Biophys* 1955, 59:491-501.
- Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H: **Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin.** *Circ Res* 2005, 96:717-722.
- Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C: **Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization.** *N Engl J Med* 2004, 351:1296-1305.
- Golper TA, Ahmad S: **L-carnitine administration to hemodialysis patients: Has its time come?** *Semin Dial* 1992, 5:94-98.
- Golper TA, Goral S, Becker BN, Langman CB: **L-carnitine treatment of anemia.** *Am J Kidney Dis* 2003, 41:S27-34.
- González EA, Martin KJ: **Renal osteodystrophy.** *Rev Endocr Metab Disord* 2001, 2:187-193.
- Goral S: **Levocarnitine's role in the treatment of patients with end-stage renal disease: a review.** *Dial Transplant* 2001, 30:530-538.
- Guarnieri G, Fonda M, Situlin R, Vasile A, Toigo G, Cattin L: **Effects of L-carnitine supplementation in the dialysate on serum lipoprotein composition of hemodialysis patients.** *Contrib Nephrol* 1992, 98:36-43.

- Günal AI, Celiker H, Dönder E, Günal SY: **The effect of L-carnitine on insulin resistance in hemodialysed patients with chronic renal failure.** *J Nephrol* 1999, 12:38-40.
- Hagen TM, Liu J, Lykkesfeldt J, Wehr CM, Ingersoll RT, Vinarsky V, Bartholomew JC, Ames BN: **Feeding acetyl-L-carnitine and lipoic acid to old rats significantly improves metabolic function while decreasing oxidative stress.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:1870-1875.
- Hou J: **Primary systemic carnitine deficiency presenting as recurrent Reye-like syndrome and dilated cardiomyopathy.** *Chang Gung Med J* 2002, 25:832-837.
- Ikizler TA: **Protein and energy: recommended intake and nutrient supplementation in chronic dialysis patients.** *Semin Dial* 2004, 17:471-478.
- Ikizler TA, Wingard RL, Harvell J, Shyr Y, Hakim RM: **Association of morbidity with markers of nutrition and inflammation in chronic hemodialysis patients: a prospective study.** *Kidney Int* 1999, 55:1945-1951.
- Kalantar-Zadeh K, Ikizler TA, Block G, Avram MM, Kopple JD: **Malnutrition-inflammation complex syndrome in dialysis patients: causes and consequences.** *Am J Kidney Dis* 2003, 42:864-881.
- Kalantar-Zadeh K, Stenvinkel P, Bross R, Khawar OS, Rammohan M, Colman S, Benner D: **Kidney insufficiency and nutrient-based modulation of inflammation.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005, 8:388-396.
- Kalousová M, Zima T, Tesař V, Škrha J, Štípek S: **Stanovení produktů pokročilé glykace a oxidace.** *Klin Biochem Metab* 2002, 10(31):11-16.
- Karmaniolas K, Ionnidis P, Liatis S, Dalamanga M, Papalambros T, Migdalis I: **Primary carnitine deficiency in a male adult.** *J Med* 2002, 33:105-110.
- Khosla S: **Minireview: the OPG/RANKL/RANK system.** *Endocrinology* 2001, 142:5050-5055.
- Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF Jr: **The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis.** *Environ Health Perspect* 1998, 106(Suppl 1):289-295.
- Kolář F: **Carnitine and cardiac diseases.** *Cor Vasa* 1994, 36:190-198.
- Kone BC: **Nitric oxide in renal health and disease.** *Am J Kidney Dis* 1997, 30:311-333.
- Kopple JD: **Effect of nutrition on morbidity and mortality in maintenance dialysis patients.** *Am J Kidney Dis* 1994, 24:1002-1009.

- Kostenuik PJ: **Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength.** *Curr Opin Pharmacol* 2005, 5:618-625.
- Kovacic V, Roguljic L, Kovacic V: **Metabolic acidosis of chronically hemodialyzed patients.** *Am J Nephrol* 2003, 23:158-164.
- Kraut JA, Kurtz I: **Metabolic acidosis of CKD: diagnosis, clinical characteristics, and treatment.** *Am J Kidney Dis* 2005, 45:978-993.
- Kronenberg F, Steinmetz A, Kostner GM, Dieplinger H: **Lipoprotein(a) in health and disease.** *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996, 33:495-543.
- Kumaran S, Deepak B, Naveen B, Panneerselvam C: **Effects of levocarnitine on mitochondrial antioxidant systems and oxidative stress in aged rats.** *Drugs R D* 2003, 4:141-147.
- Labonia WD, Morelli OH Jr, Gimenez MI, Freuler PV, Morelli OH: **Effects of L-carnitine on sodium transport in erythrocytes from dialyzed uremic patients.** *Kidney Int* 1987, 32:754-759.
- Lee SK, Lorenzo JA: **Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation.** *Endocrinology* 1999, 140:3552-3561.
- Lefèvre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol JP, Théron P, Torreilles J: **Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances.** *Ann Biol Clin (Paris)* 1998, 56:305-319.
- Levey AS, Eckardt K, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, De Zeeuw D, Hostetter TH, Lameire N, Eknoyan G: **Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO).** *Kidney Int* 2005, 67:2089-2100.
- Levey AS, Eknoyan G: **Cardiovascular disease in chronic renal disease.** *Nephrol Dial Transplant* 1999, 14:828-833.
- Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH: **Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis.** *N Engl J Med* 1974, 290:697-701.
- Liu Y, Coresh J, Eustace JA, Longenecker JC, Jaar B, Fink NE, Tracy RP, Powe NR, Klag MJ: **Association between cholesterol level and mortality in dialysis patients: role of inflammation and malnutrition.** *JAMA* 2004, 291:451-459.

- Maeda K, Shinzato T, Kobayakawa H: **Effects of L-carnitine administration on short-chain fatty acid (acetic acid) and long-chain fatty acid metabolism during hemodialysis.** *Nephron* 1989, 51:355-361.
- McGarry JD, Brown NF: **The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis.** *Eur J Biochem* 1997, 244:1-14.
- Mehrotra R, Kopple JD, Wolfson M: **Metabolic acidosis in maintenance dialysis patients: clinical considerations.** *Kidney Int Suppl* 2003, 64(Suppl 88):S13-25.
- Miyata T, Inagi R, Kurokawa K: **Diagnosis, pathogenesis, and treatment of dialysis-related amyloidosis.** *Miner Electrolyte Metab* 1999, 25:114-117.
- Nakashima A, Yorioka N, Doi S, Takasugi N, Shigemoto K, Kohno N: **Osteoprotegerin and bone mineral density in hemodialysis patients.** *Osteoporos Int* 2006, 17:841-846.
- National Kidney Foundation: **K/DOQI clinical practice guidelines for nutrition in chronic renal failure.** *Am J Kidney Dis* 2000, 35(Suppl 2):S1-S140.
- National Kidney Foundation: **K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification.** *Am J Kidney Dis* 2002, 39:S1-266.
- National Kidney Foundation: **K/DOQI clinical practice guidelines. Bone metabolism and disease in chronic kidney disease.** *Am J Kidney Dis* 2003, 42(Suppl 3):S1-S201.
- Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J: **Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction.** *Postgrad Med J* 2003, 79:195-199; quiz 198-200.
- Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H, Hashimoto N, Nikaido H, Sai Y, Koizumi A, Shoji Y, Takada G, Matsuishi T, Yoshino M, Kato H, Ohura T, Tsujimoto G, Hayakawa J, Shimane M, Tsuji A: **Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter.** *Nat Genet* 1999, 21:91-94.
- Oh MS, Uribarri J, Weinstein J, Schreiber M, Kamel KS, Kraut JA, Madias NE, Laski ME: **What unique acid-base considerations exist in dialysis patients?** *Semin Dial* 2004, 17:351-364.
- Perna AF, Capasso R, Lombardi C, Acanfora F, Satta E, Ingrosso D: **Hyperhomocysteinemia and macromolecule modifications in uremic patients.** *Clin Chem Lab Med* 2005, 43:1032-1038.

- Perna AF, Ingrosso D, Satta E, Lombardi C, Acanfora F, De Santo NG: **Homocysteine metabolism in renal failure.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004, 7:53-57.
- Prasad PD, Huang W, Ramamoorthy S, Carter AL, Leibach FH, Ganapathy V: **Sodium-dependent carnitine transport in human placental choriocarcinoma cells.** *Biochim Biophys Acta* 1996, 1284:109-117.
- Rasic-Milutinovic Z, Perunicic-Pekovic G, Pljesa S: **Clinical significance and pathogenic mechanisms of insulin resistance in chronic renal insufficiency (part II): pathogenic factors of insulin resistance in chronic renal insufficiency.** *Med Pregl* 2000, 53:159-163.
- Ravani P, Tripepi G, Malberti F, Testa S, Mallamaci F, Zoccali C: **Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risks modeling approach.** *J Am Soc Nephrol* 2005, 16:2449-2455.
- Rebouche CJ, Engel AG: **Carnitine metabolism and deficiency syndromes.** *Mayo Clin Proc* 1983, 58:533-540.
- Roche Diagnostics GmbH: Roche Applied Science. <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/11242008001a.pdf>.
- Santoro A: **Anemia in renal insufficiency.** *Rev Clin Exp Hematol* 2002, Suppl 1:12-20.
- Savica V, Santoro D, Mazzaglia G, Ciolino F, Monardo P, Calvani M, Bellinghieri G, Kopple JD: **L-carnitine infusions may suppress serum C-reactive protein and improve nutritional status in maintenance hemodialysis patients.** *J Ren Nutr* 2005, 15:225-230.
- Schönekeess BO, Allard MF, Lopaschuk GD: **Propionyl L-carnitine improvement of hypertrophied heart function is accompanied by an increase in carbohydrate oxidation.** *Circ Res* 1995, 77:726-734.
- Sebert JL, Ruiz JC, Fournier A, Fardellone P, Guéris J, Marié A, Morinière P, Codet MP, Renaud H: **Plasma bone Gla-protein: assessment of its clinical value as an index of bone formation in hemodialyzed patients.** *Bone Miner* 1987, 2:21-27.
- Sener G, Paskaloğlu K, Satiroglu H, Alican I, Kaçmaz A, Sakarcan A: **L-carnitine ameliorates oxidative damage due to chronic renal failure in rats.** *J Cardiovasc Pharmacol* 2004, 43:698-705.

- Shinohara K, Shoji T, Emoto M, Tahara H, Koyama H, Ishimura E, Miki T, Tabata T, Nishizawa Y: **Insulin resistance as an independent predictor of cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease.** *J Am Soc Nephrol* 2002, 13:1894-1900.
- Shoji T, Emoto M, Shinohara K, Kakiya R, Tsujimoto Y, Kishimoto H, Ishimura E, Tabata T, Nishizawa Y: **Diabetes mellitus, aortic stiffness, and cardiovascular mortality in end-stage renal disease.** *J Am Soc Nephrol* 2001, 12:2117-2124.
- Shug AL, Subramanian R: **Modulation of adenine nucleotide translocase activity during myocardial ischemia.** *Z Kardiol* 1987, 76(Suppl 5):26-33.
- Silver J: **Molecular mechanisms of secondary hyperparathyroidism.** *Nephrol Dial Transplant* 2000, 15(Suppl 5):2-7.
- Slama A, Brivet M, Boutron A, Legrand A, Saudubray JM, Demaugre F: **Complementation analysis of carnitine palmitoyltransferase I and II defects.** *Pediatr Res* 1996, 40:542-546.
- Slatopolsky E, Finch J, Denda M, Ritter C, Zhong M, Dusso A, MacDonald PN, Brown AJ: **Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth. High phosphorus directly stimulates PTH secretion in vitro.** *J Clin Invest* 1996, 97:2534-2540.
- Snyder S, Pendergraph B: **Detection and evaluation of chronic kidney disease.** *Am Fam Physician* 2005, 72:1723-1732.
- Suliman ME, Lindholm B, Bárány P, Bergström J: **Hyperhomocysteinemia in chronic renal failure patients: relation to nutritional status and cardiovascular disease.** *Clin Chem Lab Med* 2001, 39:734-738.
- Thomas L: **Clinical laboratory diagnostics.** TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt, Germany 1998, :203.
- Ureña P, De Vernejoul MC: **Circulating biochemical markers of bone remodeling in uremic patients.** *Kidney Int* 1999, 55:2141-2156.
- Vaz FM, Wanders R: **Carnitine homeostasis and human disease: Advances in metabolite analysis.** *LabMedica* 2002, 19:14-17.
- Vaz FM, van Gool S, Ofman R, Ijlst L, Wanders RJ: **Carnitine biosynthesis: identification of the cDNA encoding human gamma-butyrobetaine hydroxylase.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 250:506-510.

- Vazellov E, Borissova AM, Kirilov G, Assenova B, Tchetriska M, Krivoshiev S: **L-carnitine consecutively administered to patients on hemodialysis improves beta-cell response.** *Int J Artif Organs* 2003, 26:304-307.
- Veselá E, Racek J, Trefil L, Jankových V, Pojer M: **Effect of L-carnitine supplementation in hemodialysis patients.** *Nephron* 2001, 88:218-223.
- Wagenmakers A: **L-carnitine supplementation and performance in man.** *Medicine Sport Sci* 1991, 32:110-127.
- Wanders RJ, Vreken P, Ferdinandusse S, Jansen GA, Waterham HR, van Roermund CW, Van Grunsven EG: **Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases.** *Biochem Soc Trans* 2001, 29:250-267.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B: **Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia.** *Kidney Int* 1996, 49:1304-1313.

Příloha č. 1 – seznam publikovaných prací, přednášek a posterových sdělení

a) Publikace v časopisech s impakt faktorem (*impact factor* – IF)

- Šíroká R., Trefil L., Rajdl D., Racek J., Rusňáková H., Cibulka R., Eiselt J., Filipovský J.: **Asymmetric dimethylarginine, homocysteine and renal function - is there a relation?** *Clin Chem Lab Med* 2005, Vol. 43, No. 10: 1147-1150 (IF = 1,918).
- Cibulka R., Šíroká R., Trefil L., Racek J., Veselá E.: **The measurement of carnitine in hemodialysis patients - adaptation of enzymatic photometric method for an automatic analyzer.** *Clin Chem Lab Med* 2006, Vol. 44, No. 8: 983-986 (IF = 1,918).
- Šíroká R., Trefil L., Rajdl D., Racek J., Cibulka R.: **Asymmetric dimethylarginine–comparison of HPLC and ELISA methods.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, Vol. 850, 586-587 (IF = 2,391).
- Cibulka R., Racek J.: **Metabolic disorders in patients with chronic kidney failure.** *Physiol Res* 2007; Epub ahead of print (IF = 1,806).
- Cibulka R., Racek J., Pikner R., Rajdl D., Trefil L., Veselá E., Studenovská M., Šíroká R.: **Effect of L-carnitine supplementation on secondary hyperparathyroidism and bone metabolism in hemodialyzed patients.** *Calcif Tissue Int* 2007; Epub ahead of print (IF = 2,487).

b) Publikace v recenzovaných časopisech bez IF

- Cibulka R.: **Metabolické účinky karnitinu a jeho význam v medicíně.** *Klin Biochem Metab* 2005, Vol. 13 (34), No. 1: 24-28.
- Cibulka R., Racek J., Trefil L., Veselá E., Studenovská M., Rajdl D.: **Deficit L-karnitinu u hemodialyzovaných nemocných a význam jeho suplementace.** *Klin Biochem Metab* 2005, Vol. 13 (34), No. 1: 29-31.
- Cibulka R., Racek J., Veselá E.: **Význam L-karnitinu u pacientů s chronickým renálním selháním léčených hemodialýzou.** *Vnitr Lek* 2005, Vol. 51, No. 10: 1108-1113.
- Cibulka R., Racek J., Trefil L., Pikner R., Veselá E., Studenovská M.: **Suplementace L-karnitinem snižuje oxidační stres u hemodialyzovaných nemocných.** *Klin Biochem Metab* 2005, Vol. 13 (34), No. 4: 187-189.

- Šíroká R., Cibulka R., Rajdl D., Racek J.: **Asymetrický dimethylarginin – nový rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění.** *Vnitr Lek* 2006, Vol. 52, No. 3: 249-255.
- Šíroká R., Trefil L., Racek J., Cibulka R.: **Comparison of asymmetric dimethylarginine detection – HPLC and ELISA methods (technical brief).** *Klin Biochem Metab* 2006, Vol. 14 (35), No. 2: 111-113.
- Cibulka R., Šíroká R., Rajdl D., Racek J., Trefil L., Eiselt J.: **Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a novel independent risk factor for cardiovascular disease in haemodialysis patients.** *Klin Biochem Metab* 2007, Vol. 15 (36), No. 1: 39-42.
- Cibulka R., Rajdl D., Šíroká R., Eiselt J., Malánová L., Trefil L., Racek J.: **Asymetrický dimethylarginin (ADMA) jako nový nezávislý faktor přežití u hemodialyzovaných nemocných.** *Klin Biochem Metab* 2007, Vol. 15 (36), No. 3; přijato k publikaci.

c) Abstrakta

- Racek J., Veselá E., Cibulka R., Trefil L., Malánová L.: **Influence of supplementation with L-carnitine on parathyroid function in hemodialysis (HD) patients.** *Clin Chem* 2004, Vol. 50, No. 6, Suppl.: A101.
- Cibulka R., Racek J., Trefil L., Veselá E., Studenovská M., Rajdl D.: **Deficit of L-carnitine in hemodialysis patients and a potential role of its supplementation.** *Clin Chem Lab Med* 2004, Vol. 42, No. 9: A72-A73.
- Racek J., Cibulka R., Veselá E., Trefil L.: **L-carnitine supplementation decreases oxidative stress in haemodialysis patients.** *Clin Chim Acta* 2005, Vol. 355, Suppl.: S194.
- Racek J., Cibulka R., Veselá E., Trefil L., Rajdl D., Studenovská M.: **L-carnitine concentrations in hemodialysis patients and a potential role of its supplementation.** *Clin Chem* 2005, Vol. 51, No. 6, Suppl.: A192-A193.
- Cibulka R., Šíroká R., Rajdl D., Racek J.: **Asymmetric dimethylarginine as a novel independent risk factor for cardiovascular disease in hemodialysis patients.** *Atherosclerosis Suppl* 2006, Vol. 7, No. 3: 298.

- Šíroká R., Cibulka R., Rajdl D., Racek J., Trefil L.: **Asymmetric dimethylarginine – comparison of chromatography and immunometric methods.** *Atherosclerosis Suppl* 2006, Vol. 7, No. 3: 590.
- Veselá E., Cibulka R., Malánová L., Racek J., Pikner R., Rajdl D., Studenovská M., Trefil L.: **Suplementace L-karnitinem zlepšuje metabolismus osteoblastů u hemodialyzovaných nemocných.** *Aktuality v nefrologii* 2006, Vol. 12, Suppl. 1: 18.
- Cibulka R., Rajdl D., Široká R., Eiselt J., Malanova L., Trefil L., Racek J.: **Asymmetric dimethylarginine as a novel prognostic factor for survival in hemodialysis patients.** *Clin Chem Lab Med* 2007, Vol. 45, Spec. Suppl.: T048.
- Racek J., Eiselt J., Malánová L., Rajdl D., Šíroká R., Cibulka R., Trefil L.: **Asymmetric dimethylarginine as a novel prognostic factor for survival in hemodialysis patients.** *Clin Chem* 2007, Vol. 53, No. 6, Suppl.: A31.

d) Přednášky

- Cibulka R., Racek J.: **L-karnitin a jeho význam ve zdraví a nemoci.** *Vitamíny*, 13.-15.9. 2004, Pardubice, ČR.
- Cibulka R., Racek J.: **L-karnitin a jeho význam ve zdraví a nemoci.** *Mezikrajský seminář pracovníků klinické biochemie a hematologie Plzeňského a Karlovarského kraje*, 31.3. 2005, Karlovy Vary, ČR.
- Cibulka R., Trefil L., Veselá E., Racek J.: **Metabolické účinky karnitinu u hemodialyzovaných nemocných s důrazem na ovlivnění oxidačního stresu.** *45. studentská vědecká konference*, 19.5. 2005, Plzeň, ČR.
- Cibulka R., Veselá E., Studenovská M., Racek J.: **Výživa při chronickém selhání ledvin: suplementace L-karnitinu u hemodialyzovaných nemocných.** *Pokroky ve farmakoterapii 2005 pro lékaře v praxi*, 7.-9.9. 2005, Zlín, ČR.
- Cibulka R., Pikner R., Trefil L., Veselá E., Racek J.: **Suplementace L-karnitinem pozitivně ovlivňuje metabolismus osteoblastů u hemodialyzovaných nemocných.** *46. studentská vědecká konference*, 11.5. 2006, Plzeň, ČR.
- Pikner R., Cibulka R., Racek J., Trefil L., Topolčan O.: **Renální osteodystrofie – patofyziologie a laboratorní diagnostika.** *Setkání pracovníků klinické biochemie a hematologie Plzeňského a Karlovarského kraje*, 21.3. 2007, Klatovy, ČR.

- Racek J., Rajdl D., Eiselt J., Šíroková R., Cibulka R., Malánová L., Trefil L.: **Asymetrický dimethylarginin (ADMA) jako nový nezávislý faktor přežití u hemodialyzovaných nemocných.** *Imunoanalytické dny*, 1.-3.4. 2007, České Budějovice, ČR.
- Cibulka R., Eiselt J., Opatrný K. Jr., Rajdl D., Opatrná S., Racek J.: **Asymetrický dimethylarginin u hemodialyzovaných (HD) a peritoneálně dialyzovaných (PD) nemocných.** 47. studentská vědecká konference, 23.5. 2007, Plzeň, ČR.

e) Posterová sdělení

- Racek J., Veselá E., Cibulka R., Trefil L., Malanová L.: **Influence of supplementation with L-carnitine on parathyroid function in hemodialysis patients.** *56th Annual Meeting of the American Association of Clinical Chemistry*, 25.-29.7. 2004, Los Angeles, USA.
- Cibulka R., Racek J., Trefil L., Veselá E., Studenovská M., Rajdl D.: **Deficit of L-carnitine in hemodialysis patients and a potential role of its supplementation.** *Swiss MedLab & 8th Alps Adria Congress*, 5.-9.10. 2004, Luzern, Švýcarsko.
- Racek J., Cibulka R., Vesela E., Trefil L.: **L-carnitine supplementation decreases oxidative stress in haemodialysis patients.** *16th IFCC – FESCC European Congress of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine – EUROMEDLAB*, 8.-12.5. 2005, Glasgow, Skotsko.
- Racek J., Cibulka R., Veselá E., Trefil L., Rajdl D., Studenovská M.: **L-carnitine concentrations in hemodialysis patients and a potential role of its supplementation.** *XIX International Congress of Clinical Chemistry IFCC/AACC Annual Meeting*, 24.-28.7. 2005, Orlando, USA.
- Cibulka R., Racek J., Trefil L., Veselá E.: **Supplementace L-karnitinem snižuje oxidační stres u hemodialyzovaných nemocných.** *VII. celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie*, 11.-13.9. 2005, Olomouc, ČR.
- Cibulka R., Racek J., Trefil L., Veselá E.: **Supplementace L-karnitinem snižuje oxidační stres u hemodialyzovaných nemocných.** *Atherosklerosa*, 14.-16.9. 2005, Praha, ČR.
- Rajdl D., Cibulka R., Šíroková R., Racek J., Trefil L., Eiselt J., Rubášová L., Schejbalová M., Michálková R.: **Asymetrický dimethylarginin u**

hemodialyzovaných nemocných. *Konferencia učiteľ'ov chémie, biochémie a klinickej biochémie na lekárskech fakultách v ČR a SR, 25.-28.5.2006, Vrútky, Slovensko.*

- Cibulka R., Šíroká R., Rajdl D., Racek J.: **Asymmetric dimethylarginine as a novel independent risk factor for cardiovascular disease in hemodialysis patients.** *XIV International Symposium on Atherosclerosis, 18.-22.6. 2006, Řím, Itálie.*
- Šíroká R., Cibulka R., Rajdl D., Racek J., Trefil L.: **Asymmetric dimethylarginine – comparison of chromatography and immunometric methods.** *XIV International Symposium on Atherosclerosis, 18.-22.6. 2006, Řím, Itálie.*
- Veselá E., Cibulka R., Malánová L., Racek J., Pikner R., Rajdl D.: **Effect of L-carnitine supplementation on bone metabolism in haemodialysis patients.** *XLIII ERA-EDTA congress, 15.-18.7. 2006, Glasgow, Skotsko.*
- Veselá E., Šíroká R., Eiselt J., Malánová L., Racek J., Trefil L., Rajdl D., Cibulka R.: **Asymmetric dimethylarginine as a novel independent risk factor for cardiovascular disease in haemodialysis patients.** *XLIII ERA-EDTA congress, 15.-18.7. 2006, Glasgow, Skotsko.*
- Cibulka R., Šíroká R., Rajdl D., Racek J.: **Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a novel independent risk factor for cardiovascular disease in hemodialysis patients.** *XX. biochemický zjazd, 12.-16.9.2006, Piešťany, Slovensko.*
- Šíroká R., Trefil L., Racek J., Cibulka R.: **Comparison of asymmetric dimethylarginine detection – HPLC and ELISA methods.** *XX. biochemický zjazd, 12.-16.9.2006, Piešťany, Slovensko.*
- Cibulka R., Šíroká R., Rajdl D., Racek J., Trefil L., Eiselt J., Rubášová L., Schejbalová M., Michálková R.: **Asymetrický dimethylarginin u hemodialyzovaných nemocných.** *Symposium klinické biochemie FONS, 17.-19.9.2006, Pardubice, ČR.*
- Cibulka R., Racek J., Pikner R., Trefil L., Veselá E.: **Suplementace L-karnitinem pozitivně ovlivňuje metabolismus osteoblastů u hemodialyzovaných nemocných.** *Symposium klinické biochemie FONS, 17.-19.9.2006, Pardubice, ČR.*
- Cibulka R., Rajdl D., Šíroká R., Eiselt J., Malánová L., Trefil L., Racek J.: **Asymmetric dimethylarginine as a novel prognostic factor for survival in hemodialysis patients.** *17th IFCC – FESCC European Congress of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine and 60th National Congress of the Netherlands Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (NVKC) – EUROMEDLAB, 3.-7.6. 2007, Amsterdam, Nizozemsko.*

- Racek J., Eiselt J., Malánová L., Rajdl D., Šíroká R., Cibulka R., Trefil L.:
Asymmetric dimethylarginine as a novel prognostic factor for survival in hemodialysis patients. *AACC Annual Meeting*, 15.-19.7. 2007, San Diego, California, USA.

Příloha č. 2 – účast na grantových projektech a klinických studiích

- Racek J., Veselá E., Studenovská M., Trefil L., Pikner R., Cibulka R.: **Metabolické účinky podávání L-karnitinu u dialyzovaných nemocných s důrazem na ovlivnění oxidačního stresu a kalciofosfátového metabolismu.** Grant IGA NB/7350-3 (spoluřešitel).
- Šíroká R., Racek J., Cibulka R., Rajdl D., Eiselt J., Mukenšnabl P.: **Asymetrický dimethylarginin – vztah k dalším rizikovým faktorům aterosklerózy a prognóza u hemodialyzovaných pacientů.** Grant GA UK 78/2005/C/LFP (spoluřešitel).
- **A Placebo-controlled, double-blind, randomised study to evaluate the efficacy and safety of TAK-475 50 mg and 100 mg versus placebo, when co-administered with simvastatin 20 mg or 40 mg in subjects with primary dyslipidemia.** Studie TAK-475/EC 302 (investigátor).
- **A Placebo-controlled, double-blind, randomised study to evaluate the efficacy and safety of TAK-475 100 mg in subject with type 2 diabetes currently treated with lipid-lowering therapy.** Studie TAK-475/EC 304 (investigátor).
- **A multicenter, double-blind, randomized, forced-titration study to compare the efficacy and safety of the combination of 145 mg fenofibrate and 20 or 40 mg simvastatin with atorvastatin monotherapy in patients with mixed dyslipidemia at risk of cardiovascular disease not adequately controlled by 10 mg atorvastatin alone.** Studie ZOLIP C LF0242780-01 05 03 (investigátor).

Příloha č. 3 – potvrzení o přijetí článku s názvem “**Effect of L-carnitine supplementation on secondary hyperparathyroidism and bone metabolism in hemodialyzed patients**“ k publikaci do časopisu *Calcified Tissue International*

05-May-2007

Dear Dr. Cibulka,

I am happy to inform you that your manuscript entitled, Effect of L-carnitine supplementation on secondary hyperparathyroidism and bone metabolism in hemodialyzed patients; has been accepted for publication in *Calcified Tissue International*. Congratulations! To ensure rapid publication of your paper, I strongly encourage you to read the rest of this letter very carefully. It provides important information on the publication process and new options for online access to your paper.

If you have submitted a single pdf file for review, you must submit an electronic version of the text, tables and figure legends in a single Word file (on floppy or CD). Furthermore, if you have not submitted high resolution electronic images of your illustrations you must include these files as well. If you are not able to produce publication quality files, please submit at your earliest convenience one set of high quality paper prints (preferably using high gloss, photographic quality paper) to:

Calcified Tissue International
Attn: Kevin Hutchinson
Division of Bone and Mineral Diseases - Box 8301 Washington University
School of Medicine 660 S. Euclid Ave.
St. Louis, MO 63110, USA
phone: 1-314-454-8906
fax: 1-314-454-5325

If you have not done so already, please submit a Copyright Transfer Form, signed by you on behalf of all the authors. If you plan to publish color figures, you must also submit a Color Figure Reproduction Form. You can download these forms from the Manuscript Central web site (under Instructions and Forms tab on the upper right corner), or by clicking on the appropriate links below. Please, consider that your manuscript will not go into production until all the illustration material is received in our Editorial Office.

All accepted manuscripts are now copyedited for OnLine First publication. With Online First, articles can be published in electronic form several weeks before distribution of the print journal - even before the issue and page numbers have been assigned. Let me stress that articles published via Online First are not preprint versions; they are final papers that will be published in print form in a future issue of *Calcified Tissue International*. As such, Online First articles can be cited just as a printed article. For referring to these articles, either in print form or in a hypertext link, one can use the unique Digital Object Identifier (DOI). In addition, our Publisher, Springer, now offers a new publication option called Springer Open Choice™: the program that allows authors of journal articles to pay a basic fee to have their journal article made available to the public. To find out more, please visit www.springeronline.com/openchoice.

You will receive an E-mail notification from our Production Editor as soon as all the material is received, and within 6-8 weeks galley proofs of your article should be available on-line for your review.

Thank you for submitting your work to Calcified Tissue International.

My best regards and congratulations,

Dr. Roberto Civitelli , Editor
civitellir@msnotes.wustl.edu, calcified_tissue@msnotes.wustl.edu

Copyright Transfer Form:

<http://mc.manuscriptcentral.com/societyimages/cti/00223-copyright-form.pdf>

Color Figure Reproduction Form:

http://www.springeronline.com/sgw/cda/pageitems/document/cda_downloaddocument/0,11996,0-0-45-156258-0,00.pdf

Souhlas se zapůjčováním dizertační práce

Tímto dávám souhlas se zapůjčováním své dizertační práce.

MUDr. Roman Cibulka