

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 30 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. 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 užitá žádná speciální kritéria pro zařazení do studie. Zařazení byli tedy všichni chronicky emodialyzovaní 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).

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 suplementovaných 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 nutrice a zánětu: albumin (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6), prealbumin, transferin (0, 3, 6), Creaktivní protein (CRP) (0, 6);
- ukazatele oxidačního stresu: antioxidační enzymy SOD a GPx, GSH v erythrocytech, 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 užita 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, typy 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 hyperparathyreoidismus. Největší důraz byl kladen na poslední dva jmenované bloky, tj. na oxidační stres a kalciofosfátový metabolismus.