

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Lékařská fakulta v Plzni**



**Biokompatibilita peritoneálních dialyzačních roztoků**

*Biocompatibility of peritoneal dialysis solutions*

Dizertační práce

**MUDr. Anna Pöpperlová**

školitel prof. MUDr. Sylvie Opatrná, Ph.D.

Plzeň 2015



## OBSAH

PROHLÁŠENÍ.....	5
ABSTRAKT .....	6
SUMMARY.....	8
SEZNAM POUŽÍVANÝCH ZKRATEK .....	10
ÚVOD .....	12
1 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY .....	15
1.1 Charakteristika peritonea, biokompatibilita PD roztoků .....	15
1.2 Vznik a působení GDP .....	17
1.3 Vznik a působení AGEs.....	19
1.4 RAGE a jeho ligandy .....	21
1.5 Markery peritoneální homeostázy.....	22
1.6 Role CA 125 ve vztahu k mezoteliálním buňkám při posuzování biokompatibility PD roztoků .....	25
1.7 CA 125 u PD pacientů – systémové hladiny .....	28
2 PŮVODNÍ PRÁCE.....	29
3 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	30
4 SOUBOR NEMOCNÝCH A METODIKA.....	31
4.1 Studie 1 - Peritoneální dialýza s nízkou zátěží GDP příznivě ovlivňuje plazmatické hladiny prozánětlivých ligand receptoru pro AGEs.....	32
4.1.1 Soubor nemocných a základní klinická data .....	32
4.1.2 Metodika.....	33
4.1.3 Statistická analýza.....	33
4.2 Studie 2 - Efekt icodextrinu a glukózového bikarbonát/laktátového roztoku na populaci buněk v dialyzátu a markery biokompatibility IL-6 a CA 125 u incidentních PD pacientů .....	34
4.2.1 Soubor nemocných a základní klinická data .....	34
4.2.2 Metodika.....	35
4.2.3 Statistická analýza.....	36
5 ŘEŠENÍ A VÝSLEDKY VÝZKUMU .....	37
5.1 Studie 1 .....	37
5.1.1 PD pacienti .....	37
5.1.2 CKD a HV .....	38
5.2 Studie 2.....	39
5.2.1 Charakteristika buněčné populace v dialyzátu .....	39
5.2.2 Markery biokompatibility IL - 6 a CA 125 v dialyzátu .....	39

5.2.3	Analýza souhrnných dat .....	40
5.2.4	Systemové markery zánětu, CA 125 a D / P kreatinin.....	40
6	HODNOCENÍ STUDIÍ A DISKUZE .....	41
6.1	Studie 1 .....	41
6.1.1	EN – RAGE .....	41
6.1.2	HMGB – 1.....	42
6.1.3	s – RAGE .....	43
6.1.4	GDP .....	44
6.2	Studie 2.....	45
6.2.1	Buněčná populace dialyzátu .....	45
6.2.2	Markery biokompatibility v dialyzátu.....	46
7	ZÁVĚR.....	49
8	PODĚKOVÁNÍ A PODPORA .....	50
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	51
10	TABULKY A GRAFY .....	61
11	ORIGINÁLNÍ PRÁCE, KTERÉ JSOU SOUČÁSTÍ DIZERTAČNÍ PRÁCE .....	72

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité zdroje a literaturu. Současně prohlašuji, že tato práce nebyla a nebude využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze této práce za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací a souhlasím se zapůjčováním této práce.

V Plzni dne .....

MUDr. Anna Pöpperlová

Podpis .....

## ABSTRAKT

Peritoneální dialýza (PD) je metodou náhrady funkce ledvin využívající peritonea jako dialyzační membrány. PD roztoky indikované k odstraňování dusíkatých katabolitů, excesivní plazmatické tekutiny, korekci elektrolytových poruch a acidobáze jsou vyvíjeny s ohledem na udržení homeostázy a obranyschopnosti peritonea a jsou vyvíjeny tak, aby vyvolávaly co nejnižší lokální a systémovou zánětlivou odpověď. Vlivem chronického působení PD roztoků na peritoneum dochází k jeho přestavbě s pozdější případnou ztrátou schopnosti ultrafiltrace. Za pozdní komplikace a přestavbu peritonea jsou nejvíce zodpovědné vysoké koncentrace glukózy obsažené v PD roztocích a dále přítomnost a vznik degradačních produktů glukózy (GDP) a pokročilých produktů glykace (AGEs) reagujících v peritoneální dutině.

Cílem naší dizertační práce je v první části sledování různých PD roztoků s rozdílným obsahem glukózy a GDP a pomocí ligandů pro receptor AGEs se vyjádřit k jejich systémovým účinkům a nalézt PD roztoky s nejvyšší biokompatibilitou. V této části popisujeme konvenční glukózové roztoky, roztoky s nízkou zátěží glukózy a GDP a PD roztoky na bázi polymeru glukózy (icodextrin) a sledujeme hladiny solubilního receptoru pro AGEs (s – RAGE) a jeho ligand, nově identifikovaného extracelulárního ligandu pro receptor RAGE (EN – RAGE) a high - mobility group box - 1 proteinu (HMGB – 1) v plazmě a dialyzátu a hledáme souvislosti mezi sledovanými ligandy a systémovými markery zánětu a vlastnostmi peritonea.

V této části jsme prokázali, že pacienti léčení v PD režimu s nižší zátěží GDP vykazovali nižší plazmatické hladiny prozánětlivých ligand EN – RAGE a HMGB – 1, to znamená, že můžeme tvrdit, že tyto roztoky vyvolávají nižší lokální zánětlivou odpověď a jsou spojeny s nižší tvorbou AGEs v systémové cirkulaci.

V další části pak pomocí sledování buněčné populace v dialyzátu sledujeme vliv icodextrinového PD roztoku na mezoteliální buněčnou masu a pozorujeme vztah změn buněčné populace k zánětlivým markerům (IL - 6) a markeru mezoteliální masy (CA 125).

V této části jsme u icodextrinového PD roztoku prokázali korelaci mezi hladinami CA 125 a markery zánětu, což si vysvětlujeme aktivací intraperitoneální inflamace zvyšující produkci CA 125 u mezoteliálních buněk peritonea.

Naše poznatky by se do budoucna mohly uplatnit např. při využití EN – RAGE a HMGB -1 jako citlivých ukazatelů biokompatibility, při prokázaném úzkém vztahu s markery zánětu, a

k nasměrování dalšího výzkumu směrem k hledání nových, spolehlivějších markerů mezoteliální masy, které by přesněji reflektovaly biokompatibilitu PD roztoků.

**Klíčová slova** - peritoneální dialýza – degradační produkty glukózy – pokročilé produkty glykace – peritoneální mezoteliální buňky – CA 125 – interleukin - 6

## SUMMARY

Peritoneal dialysis (PD) is a form of renal replacement therapy using the peritoneum as a dialysis membrane. PD solutions employed to remove nitrogen metabolites and excess plasma fluid, and to restore electrolyte and acid-base balance are being developed to minimize local and systemic inflammatory responses while maintaining peritoneal homeostasis and host defense. The effect of chronic action of PD solutions on the peritoneum results in its remodeling and, possibly, eventual loss of peritoneal ultrafiltration capacity. Factors most responsible for late complications and peritoneal remodeling include high glucose levels in PD solutions, and the presence and formation of glucose degradation products (GDP) and advanced glycation end - products (AGEs) in the peritoneal cavity.

The aim of our study described in this dissertation was to test various PD solutions with different glucose content and GDP and, using AGEs receptor ligands, to define their systemic effects and identify PD solutions with highest biocompatibility. This part of the dissertation characterizes conventional glucose - based solutions, low - glucose and GDP load solutions as well as glucose polymer (icodextrin) - based PD solutions while determining the plasma and dialysate levels of soluble receptor for AGEs (s - RAGE) and its ligands, extracellular newly identified receptor for AGE (EN - RAGE) and high - mobility group box - 1 protein (HMGB - 1) in our search for any associations between the above ligands and systemic markers of inflammation on the one hand, and peritoneal characteristics on the other.

In part 1 of our study, patients receiving low - GDP load PD solutions were shown to have lower plasma levels of pro - inflammatory EN - RAGE and HMGB - 1 ligands, the implication being these solutions induce a smaller local inflammatory response and are associated with lower rates of AGEs production in the systemic circulation.

In another part of our study we investigated, using a dialysate cell population, the effect of icodextrin - based PD solution on mesothelial cell mass, and the relation of changes in the cell population to inflammatory markers (IL - 6) and a mesothelial mass marker (CA 125).

In this part of the study we demonstrated, using the icodextrin - based PD solution, a correlation between CA 125 and inflammatory markers that could be possibly explained by intraperitoneal inflammation enhancing CA 125 production by peritoneal mesothelial cells.



Based on our findings and given their strong correlation with inflammatory markers, EN - RAGE and HMGB - 1 could possibly serve as sensitive markers of biocompatibility and help guide future search for novel, more reliable mesothelial mass markers that would more closely reflect the biocompatibility of PD solutions.

**Keywords** - peritoneal dialysis - glucose degradation products - advanced glycation end - products - peritoneal mesothelial cells - CA 125 - interleukin - 6

## SEZNAM POUŽÍVANÝCH ZKRATEK

3,4 - DGE - 3,4 – dideoxyglukozon

3 - DG - 3 – deoxyglukozon

3 - DGal - 3 – deoxygalaktozon

5 - HMF - 5 – hydroxymethylfuraldehyd

AGEs - pokročilé produkty glykace (advanced glycation end - products)

APD - automatizovaná peritoneální dialýza (automated peritoneal dialysis)

AR – appearance rate

BSA – tělesný povrch (body surface area)

BMI – body mass index

CA 125 - Cancer antigen 125

CAPD - kontinuální ambulantní peritonální dialýza (continuous ambulatory peritoneal dialysis)

CKD - chronické onemocnění ledvin (chronic kidney disease)

CRP – C – reaktivní protein

D - Dianeal ® Baxter Healthcare, Castlebar, Ireland

D / P - poměr hladiny mezi dialyzátem a plazmou

E – Extraneal ®, Baxter Healthcare, Castlebar, Ireland

eff – dialyzát (effluent)

ELISA – Enzyme - Linked ImmunoSorbent Assay

EMT – epitelo – mesenchymální tranzice (epithelial - to - mesenchymal transition)

EN - RAGE - nově identifikovaný extracelulární ligand pro receptor RAGE

GDP - degradační produkty glukózy

GFR – glomerulární filtrace (glomerular filtration rate)

Hb – hemoglobin

HGF - hepatocytární růstový faktor (hepatocyte growth factor)

HMGB - 1 – high - mobility group box - 1 protein

HV - zdraví dobrovolníci (healthy volunteers)

IL - 1 $\beta$  - interleukin - 1 $\beta$

IL - 6 – interleukin – 6

Kt / V – dávka dialýzy (K - clearance urey, t - čas dialýzy, V - distribuční objem pro ureu)

INF -  $\gamma$  - interferon –  $\gamma$

MIF - migraci makrofágů inhibující faktor (macrophage migration inhibitory factor)

NGAL - lipokalin – 2 (neutrophil gelatinase-associated lipocalin)

NS – nesignifikantní (not significant)

P – Physioneal ®, Baxter Healthcare, Castlebar, Ireland

p – hladina významnosti

PD - peritoneální dialýza

PET - peritoneální ekvilibrační test

r – korelační koeficient

RAGE - receptor pro pokročilé produkty glykace

rIL - 1 $\beta$  - rekombinantní interleukin - 1 $\beta$

RRF - reziduální renální funkce

s - RAGE – solubilní receptor pro AGEs

TNF -  $\alpha$  - tumour necrosis factor –  $\alpha$

UF – ultrafiltrace

VEGF - vaskulární endoteliální růstový faktor

## ÚVOD

Peritoneální dialýza (PD) je šetrnou metodou náhrady funkce ledvin, která je založená na principu filtrace a difúze s využitím semipermeabilní peritoneální membrány, kde dochází k očišťování krve od metabolických zplodin a nadbytečné tekutiny pomocí koncentračního gradientu v používaných PD roztocích napouštěných do peritoneální dutiny. Celosvětově je užívána asi u 11 % pacientů [Jain AK et al. 2012], v České republice je aktuálně 8,1% nemocných evidovaných na léčbě PD [Rychlík I, 2013].

PD má dvě formy provedení. Buď je prováděna formou kontinuální (CAPD), kdy jsou indikovány 3 - 4 denní výměny s jednou noční prodlevou a tím je zajištěna kontinuální dialýza, nebo je prováděna formou přístrojovou (APD), kdy probíhá série krátkých výměn v průběhu noci s jednou denní prodlevou o malém objemu. Výhodou PD je možnost léčby v domácím prostředí s pravidelnými ambulantními kontrolami ošetřujícím nefrologem. Nemocní navíc profitují z plynulosti náhrady funkce ledvin (24 / 7) dané principem zvolené metody, kdy jsou uchráněni před rychlými změnami intravaskulárního objemu a před výkyvy vnitřního prostředí běžnými pro hemodialýzu.

Výměna metabolitů a tekutiny v peritoneální dutině probíhá obousměrně mezi kapilárami peritonea a dialyzačním roztokem za využití difúze a konvekce. Rychlost výměny je ovlivněna molekulovou hmotností rozpuštěných látek a propustností peritonea. Nadbytečná plazmatická tekutina je odstraňována v důsledku rozdílného osmotického tlaku mezi dialyzačním roztokem a plazmou.

Složení PD roztoků bylo navrženo s ohledem na udržení homeostázy vnitřního prostředí. PD roztoky se skládají z několika složek zahrnujících elektrolyty, pufr a osmotické činidlo. Elektrolytové složení PD roztoku odpovídá extracelulární tekutině a / nebo potřebám korekce poruchy elektrolytů daným selháním ledvin. PD roztoky většinou neobsahují kalium, aby tak bylo dosaženo maximálního koncentračního gradientu k léčbě hyperkalémie provázející renální selhání. Ke korekci metabolické acidózy jsou v PD roztocích obsaženy pufrý. V roztocích byl dříve používán acetát, u kterého byla prokázána asociace se sklerózující peritonitidou, a proto byl postupně nahrazen laktátem v suprafyziologické koncentraci, který koriguje acidózu výměnou za plazmatický bikarbonát. Jsou používány i bikarbonátové roztoky, kde je nutné využití dvoukomorového systému k zabránění precipitace vápenatých a hořečnatých solí, a pak i roztoky kombinující oba pufrý, tzn. bikarbonát / laktátové [OPATRná S., 2009].

Osmotické agens v roztocích je zodpovědné za odstranění nadbytečné tekutiny z organismu, tzv. ultrafiltraci (UF). Původní konvenční roztoky dosahují vysoké osmolality a obsahují glukózu v koncentracích od 1,36 do 4,25 %. Glukóza je v krátkých výměnách účinná, ale při dlouhé prodlevě jsou její malé molekuly rychle resorbovány a ztrácí se její osmotická aktivita. Navíc její absorpce může vést k různým metabolickým změnám jako je hyperglykémie, hyperinzulinémie, hyperlipidémie a nárůst hmotnosti. Dalším osmotickým činidlem používaným v PD roztocích je směs esenciálních a neesenciálních aminokyselin, které jsou v roztoku stejně potentní jako glukózový roztok o nejnižší koncentraci, navíc se zde využívá profitu z částečné absorpce aminokyselin do systémového oběhu. Posledním z nejvíce rozšířených osmotických činidel je polymer glukózy icodextrin o vysoké molekulové hmotnosti, který je v používané koncentraci izosmolární se sérem a pH roztoku se více blíží fyziologickému ve srovnání s glukózovými roztoky. Navíc není z peritonea resorbován a navozuje účinnější ultrafiltraci po delší dobu než glukóza [Teitelbaum I, 2003]. Jak aminokyselinové, tak icodextrinové roztoky mohou být používány pouze jednou denně.

Při dlouhodobé PD dochází vlivem chronického působení PD roztoků na peritoneum k jeho změnám a postupné ztrátě ultrafiltrační schopnosti a krajně až k selhání metody náhrady funkce ledvin. Snižování životnosti peritonea jako dialyzační membrány a snížení obranyschopnosti peritonea proti infekci je dáno bioinkompatibilitou používaných dialyzačních roztoků. Za bioinkompatibilitu PD roztoků jsou zodpovědné hlavně vysoké koncentrace glukózy a laktátu, hyperosmolalita používaných roztoků, nízké pH roztoků a přítomnost a vznik degradačních produktů glukózy (GDP) a pokročilých produktů glykace (AGEs) se všemi svými lokálními a systémovými účinky vedoucími k přestavbě peritonea dané lokální neoangiogenezí s následnou fibrotizací peritonea a ve svém důsledku ke zvýšené systémové aterosogenezi a zvýšené kardiovaskulární morbiditě a mortalitě nemocných [Gokal R, 2002; Parikova A et al. 2007; Lai KN, 2010].

Od počátků PD jsou vyvíjeny roztoky slibující co nejvyšší biokompatibilitu s co nejnižší lokální a systémovou odpovědí vedoucí k delšímu zachování peritonea jako funkční dialyzační membrány. Snahy byly vyvíjeny směrem k objevu nového osmotického agens místo glukózy a ke způsobu, jak zabránit nebo omezit vzniku GDP a s nimi spojených komplikací. Ideálně by osmotické agens nemělo být vstřebáváno, mělo by být metabolizováno za vzniku netoxických degradačních produktů, mělo by být inertní k peritoneu, osmoticky efektivní i při nízkých koncentracích, bez metabolických důsledků při jeho absorpci s eventuální výživovou hodnotou a bez potlačení obranných schopností peritonea.

Jako nové osmotické agens byl v minulosti zkoušen dextran, ale nebylo u něho dosahováno požadované ultrafiltrace a navíc byl ve velkém množství absorbován a jeho akumulace v těle blokovala retikuloendoteliální systém [Hain H et al. 1989]. U diabetiků byly zkoušeny PD roztoky obsahující xylitol s příslibem poklesu metabolických komplikací diabetu a glykémie, avšak projevíly se jeho četné nežádoucí účinky zahrnující jak laktátovou acidózu, tak zhoršení funkcí jater a proto bylo od jeho dalšího užívání upuštěno [Bazzato G et al. 1982]. U diabetiků bylo také zvažováno používání glycerolu jako osmotického agens s využitím jeho malé molekulové hmotnosti a vysoké osmolality, ale měl nižší ultrafiltrační schopnost ve srovnání s glukózou a navíc docházelo k jeho akumulaci vedoucí k hyperosmolalitě plazmy a hypertriglyceridémii [Heaton A et al. 1986].

Novější osmotické činidlo kromě icodextrinu zatím nebylo do všeobecné praxe zavedeno, ale výzkum se tímto směrem i nadále obrací. Recentně je zatím ve zvířecích modelech sledován taurin (kyselina 2 - aminoethansulfonová), látka malé molekulové hmotnosti s vysokou rozpustností ve vodě, s nízkou lipofilitou, se schopností udržet neutrální pH a silným pufrovacím účinkem. Ve zvířecích modelech zatím nebyly prokázány žádné toxické účinky a je tedy zatím velmi slibným kandidátem dalšího výzkumu [Nishimura H et al. 2009]. Dalším slibným osmotickým činidlem se do budoucna zdá být maltóza [Shu ZJ et al. 2010] a nejnovějším cílem výzkumu je L-karnitin, který jako aminokyselinový derivát napomáhá transportu mastných kyselin do mitochondrií a jako součást glukózových PD roztoků ve srovnání s konvenčními má zatím slibné výsledky [De Vecchi AF et al. 2011; Bonomini M et al. 2013].

Cílem naší práce je pak posoudit biokompatibilitu běžně užívaných PD roztoků (glukózového, laktátového a icodextrinového) z pohledu stimulace mikrozánětu a vzniku AGEs ve vztahu ke klinickým parametrům adekvátní PD [permeabilita peritonea, UF, peritoneální clearance, reziduální renální funkce (RRF)] a posoudit validitu běžně užívaných markerů biokompatibility.

# 1 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

## 1.1 Charakteristika peritonea, biokompatibilita PD roztoků

Parietální a viscerální peritoneum má tloušťku asi 40  $\mu\text{m}$  a je pokryto vrstvou mezoteliálních buněk na tenké bazální membráně, pod kterou je vazivová tkáň se sítí kapilár. Mezotelie mají zásadní úlohu v udržení homeostázy peritonea a jeho regenerace. Nefyziologická povaha PD roztoků je jedním z faktorů vedoucích ke zhoršování kvality peritonea. Během PD jsou mezoteliální buňky chronicky vystavovány účinkům PD roztoků, jsou opakovaně poškozovány a opakovaně zahajují regeneraci. Perzistující chronická peritoneální inflamace, exacerbovaná akutními epizodami peritonitidy, vede ke strukturálním abnormalitám peritonea, které zahrnují ztrátu mezoteliálních buněk, submezoteliální fibrózu, subendoteliální angiogenezi a vaskulární hyalinizaci. Dlouhodobá aplikace PD je tak limitována morfologickými změnami peritonea vedoucími ke ztrátě UF kapacity peritonea a tím k technickému selhání metody, které vede ke zvýšené morbiditě a mortalitě nemocných [Fernández - Perpén A et al. 2012; Mittelmaier S, 2012].

Biokompatibilita PD roztoků je dána jejich chemickým složením a vlastnostmi, především pH, použitými pufrů a koncentrací glukózy. Hlavním určujícím faktorem biokompatibility je obsah degradačních produktů glukózy (GDP), vznikajících z osmotického činidla glukózy v průběhu tepelné sterilizace PD roztoků [Mittelmaier S, 2012]. GDP vznikají procesem tepelné sterilizace a uchováváním glukózy v přítomnosti laktátu v PD roztocích, což podporuje produkci aldehydů o malé molekulové hmotnosti obsahujících jednu nebo více reaktivních karbonylových skupin. GDP obecně poškozují buněčné funkce, reagují s buněčnou membránou, snižují buněčný metabolismus, poškozují DNA a buněčné proteiny, což při dlouhodobé PD vyúsťuje do poškození peritoneální membrány [Lee E et al. 2011]. Zvýšená koncentrace GDP vzniká nejen při tepelné sterilizaci konvenčních glukózových PD roztoků, ale také při jejich skladování. Jako osmotické činidlo je v nich používána dextróza. Nejběžnější formou PD roztoků je jednokomorový vak, ve kterém je glukóza sterilizována v laktátovém roztoku při pH 5,0 - 6,0. Zvýšenému vzniku GDP při tepelné sterilizaci a skladování se dá předejít používáním systému vícekomorových vaků s alternativním osmotickým činidlem. Proto byly vyvinuty vaky se dvěma oddělenými komorami - jedna s glukózou o vysoké koncentraci při nízkém pH a druhá s pufrůvacím roztokem (laktátovým, bikarbonátovým nebo bikarbonát / laktátovým). Tyto roztoky mají pH v rozmezí 6,2 - 7,4 a glukóza je sterilizována v odděleném kompartmentu, kde je ve vysoké koncentraci a za nízkého pH (2 - 2,6). Tento systém navíc separuje vápník a hořčík od bikarbonátu a zabraňuje tak precipitaci vápenatých solí. Jednotlivé kompartmenty se směšují až přímo před

použitím. Výhodou těchto vaků pak není pouze redukce vzniku GDP, ale také prokázaná vyšší biokompatibilita díky neutrálnímu pH roztoku a díky užití více fyziologického bikarbonátu jako pufru [Perl J, 2011]. Nízká koncentrace GDP ve dvoukomorových vacích je pak přisuzována velmi nízkým hodnotám pH v glukózové komoře, které brání vzniku GDP při sterilizaci horkem.



## 1.2 Vznik a působení GDP

V používaných glukózových PD roztocích bylo dosud identifikováno minimálně 15 molekul GDP, kdy za hlavní a nejhojnější degradační produkt glukózy je považován 5 - hydroxymethylfuraldehyd (5 - HMF), který ale nemá téměř žádnou buněčnou toxicitu. Naopak za nejtoxičtější je považován 3,4 - dideoxyglukozon (3,4 - DGE). Seznam GDP je uveden v tabulce 1 [Witowski J, 2000; Lee E et al. 2011].

Použitím kultury lidských peritoneálních mezoteliálních buněk získaných z omenta bylo prokázáno, že expozice šesti GDP (acetaldehyd, formaldehyd, furaldehyd, glyoxal, methylglyoxal a 5 - HMF) v koncentracích typických pro konvenční roztoky, nebyla spojena s krátkodobou toxicitou, ale po 6 týdnech jejich působení byla významně snížena viabilita a funkce těchto buněk [Witowski J et al. 2001]. 3,4 - DGE se prokázal jako nejúčinnější v inhibici proliferace mezoteliálních buněk a jako jediný z GDP stupňuje apoptózu jak periferních leukocytů, tak epiteliálních buněk renálních tubulů [Perl J, 2011]. 3,4 - DGE a formaldehyd jsou nejmocnějšími GDP zodpovědnými za zhoršenou reparaci mezoteliálních buněk v odpovědi na jejich poškození, významně tak zpomalují remezotelializaci peritonea. Poškození mezotelí se tak stává chronickým, peritoneální membrána progresivně vaskularizuje a vykazuje zvýšenou fibrotizaci s přítomností zánětlivých buněk. To vede ve svém důsledku k morfologickým změnám peritonea a jeho UF selhání [le Poole CY et al. 2012].

Glukóza je jediným zdrojem sacharidů v PD roztocích, ze kterého vznikají GDP. I přesto byl identifikován nový degradační produkt glukózy v PD roztocích 3 - deoxygalaktozon (3 - DGal), který vzniká z galaktózy jako přímého prekursoru. Derivuje se z 3 - deoxyglukozonu (3 - DG) s meziproduktem 3,4 - DGE. Bylo potvrzeno, že 3 - DG, 3,4 - DGE a 3 - DGal mohou být konvertovány jeden v druhého pomocí reverzibilních reakcí. 3 - DG je prvním degradačním produktem glukózy, který vzniká během tepelné sterilizace PD roztoků, jeho následná dehydratace vede ke vzniku 3,4 - DGE a jeho transformací vzniká 3 - DGal. Všechny tyto reakce jsou reverzibilní, 3,4 - DGE přitom vzniká jako mezistupeň. Ve dvoukomorových vacích byly zjištěny 10 až 20 násobně nižší koncentrace 3 - DGal ve srovnání s jednokomorovými systémy, což poukazuje na jejich vyšší biokompatibilitu [Mittelmaier S et al. 2011]. Po napuštění PD roztoku GDP z roztoku rychle mizí zřejmě díky systémové absorpci, protože po zahájení PD bylo pozorováno zvýšení plazmatické hladiny 3 - DG. Ukázalo se, že režim PD s nízkou zátěží glukózy je výhodný z hlediska nižší zátěže 3 - DG a nižší zátěže glukózy vedoucí k nižším plazmatickým hladinám 3 - DG [le Poole CY et al. 2012].

Poškození mezotelií a apoptóza způsobená GDP vede k intracelulární produkci peroxidu vodíku a k formaci volných radikálů, které jsou důležitými spouštěcími faktory inflamace peritoneální membrány a jejího poškození. V krysím modelu bylo prokázáno, že expozice GDP vedla k excesivní proliferaci buněk podobným mezenchymálním (*mesenchym - like cells*), které mohou být odvozeny při epitel - mezenchymální přeměně, kdy peritoneální mezoteliie podstupují přechod do fenotypu fibroblastům podobných buněk (*fibroblast - like*) a jsou považovány za klíčový mediátor peritoneální fibrózy [Perl J, 2011]. Přeměna epitelálních buněk v mezenchymální (*epithelial - to - mesenchymal transition - EMT*) ve vrstvě peritoneálních mezoteliálních buněk je mechanismem startujícím poškození peritoneální membrány. Mění se mezenchymální buňky získávají „ne - epiteloidní“ vzhled, který je spojen se ztrátou E - cadherinu (transmembránový protein s klíčovou úlohou v buněčné adhezi) a se zvýšenou produkcí vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), fibronektinu (proteinový dimer ovlivňující buněčnou adhezi, růst, migraci a diferenciaci) a kolagenu, což koreluje se zvýšením UF peritonea. Mezoteliální buňky exprimují receptory pro pokročilé produkty glykace (AGEs) - RAGE a jejich aktivací je možné iniciovat EMT. Používání PD roztoků s nízkým obsahem GDP bylo spojeno s pozorovanou rychlejší remezotelializací peritonea, se sníženou EMT a nižší fibrotizací. GDP jsou resorbovány peritoneální membránou a zvyšují tak systémové hladiny karbonylů [Fernández - Perpén A et al. 2012].

### 1.3 Vznik a působení AGEs

Dle údajů z 90. let již 8 let po zahájení PD více než 85 % pacientů ukončilo terapii kvůli selhání metody nebo kvůli úmrtí. Okolo 50 % úmrtí bylo v důsledku kardiovaskulární příčiny. Vysoké kardiovaskulární riziko nebylo možné plně vysvětlit tradičními rizikovými faktory, jakými jsou diabetes, dyslipidemie a hypertenze. Zájem byl proto zaměřen k jiným předpokládaným rizikovým faktorům urychlené aterosklerózy u PD pacientů a to k pokročilým produktům glykace (AGEs), oxidačnímu stresu, endoteliální dysfunkci a inflamaci. AGEs jsou formovány sérií neenzymatických reakcí mezi volnými aminokyselinovými skupinami proteinů a lipidů s glukózou nebo GDP [Le Poole CY et al. 2012]. GDP jsou mocnějšími prekurzory AGEs než glukóza sama o sobě, podporují transformaci prekurzorů glykosylace v konečnou formu AGEs. Více než 80 % AGEs, které vznikají kontaktem s PD roztoky, jsou generovány GDP. Pouze minimální část AGEs vzniká za působení samotné glukózy. Dlouhodobé používání PD roztoků s vysokým obsahem GDP vede k akumulaci různých AGEs v peritoneu. GDP z PD roztoků jsou absorbovány do peritonea. Předpokládá se, že AGEs odvozené od GDP nepostihují pouze proteiny, ale také DNA. U uremických pacientů byla nalezena akumulace hlavního pokročilého produktu glykované DNA N<sup>2</sup>-carboxyethyl-2-deoxyguanosinu v ledvinách a aortě [Mittelmaier S, 2012].

Akumulace AGEs je v běžné populaci spojena s postupujícím věkem, v mladším věku je výskyt zvýšen ve spojení s diabetem nebo chronickou renální insuficiencí. U pacientů léčených PD se vyskytuje několik faktorů usnadňujících nebo indukujících formování AGEs:

1. Chronické působení konvenčních glukózo - laktátových PD roztoků s vysokým obsahem glukózy a GDP, které vede k vyššímu výskytu prekurzorových molekul AGEs.
2. Uremické prostředí, které je spojeno s vysokým karbonylovým stresem, nutným k formaci AGEs.
3. Ztráta reziduální renální funkce, která vede ke snížené clearance AGEs.

AGEs mají potenciál zvyšovat vaskulární propustnost porušením vaskulární bazální membrány díky zesíťování (*cross-linking*) proteinů se složkami bazální membrány nebo aktivací receptorů pro AGEs - RAGE na endoteliálních buňkách. AGEs vázané na RAGE stimulují aktivaci a upregulaci vaskulární buněčné adhezivní molekuly -1 (vascular cell adhesion molecule - 1) na mezoteliálním povrchu. Tato molekula má základní roli v podpoře leukocytární adheze, která může aktivovat inflamaci a vést k peritoneálnímu poškození [Nakashima A et al. 2010]. Mezi AGEs se řadí např. karboxymetyllysin (CML), metylglyoxal (MGO), pentosidin a imidazolony. Imunohistochemické analýzy ukázaly, že AGEs se akumulují převážně v aterosklerotických plátech u nemocných v konečném stadiu renálního

selhání. Akumulace AGEs ve tkáních vykazuje charakteristickou autofluorescenci [Nishizawa Y, 2012].

AGEs jsou považovány za biomarkery metabolického stresu. Akumulace AGEs u pacientů s chronickým onemocněním ledvin (CKD) je výsledkem jejich retence při snížené glomerulární filtraci, zpomalené renální metabolizaci, dále při zvýšeném oxidativním stresu, dyslipidemii a u diabetiků též hyperglykémii [Nasrallah MM et al. 2012]. AGEs mohou být akumulovány ve formě modifikovaných (glykovaných) proteinů nebo ve formě volných sloučenin vznikajících proteolýzou glykovaných proteinů, trávením glykovaných proteinů přijatých potravou nebo přímou glykací aminokyselin. Tyto volné sloučeniny mají vysokou renální clearance, jsou metabolizovány převážně ledvinami a z těla jsou vylučovány močí [Henning C et al. 2011; Oleniuc M et al. 2012].

## 1.4 RAGE a jeho ligandy

AGEs uplatňují své účinky cestou RAGE. RAGE je multiligandový receptor, je součástí skupiny imunoglobulinových proteinů buněčného povrchu, který vzájemně reaguje se širokým spektrem ligandů, které zahrnují AGEs, modifikované lipoproteiny, amyloidové fibrily a high - mobility group box - 1 protein (HMGB - 1) [Zakiyanov O et al. 2011]. Vazba AGEs a RAGE vyúsťuje v rychlou a trvalou buněčnou aktivaci a genovou transkripci, která vede k indukci zánětlivé odpovědi, která může vést k aterosklerotickým procesům a vyúsťit v rozmanité mikro - a makro - vaskulární komplikace [Nakashima A et al. 2010]. RAGE je považován za centrální regulátor vaskulární inflamace a aterosklerózy.

RAGE je u nemocných se sníženou renální funkcí akumulován a existuje v několika variantách. Jednou z jeho forem je solubilní, cirkulující s - RAGE (50 kDa) [Forbes JM et al. 2005], který pravděpodobně vzniká odštěpením od RAGE, vázaného na buněčném povrchu, metalloproteinázami nebo alternativním sestřihem a liší se chybějící C - terminální - transmembránovou doménou [Kim JK et al. 2012]. Solubilní RAGE účinně váže cirkulující peptidy a ligandy včetně AGEs, čímž antagonizuje signalizaci RAGE na tkáňové úrovni a inhibuje zánětlivou odpověď. Jeho snížené hladiny jsou spojovány s aterosklerózou a kardiovaskulárními chorobami u CKD nemocných [Nakashima A et al. 2010; Nasrallah MM et al. 2012].

Nově identifikovaný extracelulární ligand pro receptor RAGE (EN - RAGE) (10,6 kDa) [Mirmohammadsadegh A et al. 2000] je hojně vytvářen neutrofily a monocyto - makrofágovým systémem. Je přirozeným prozánětlivým ligandem RAGE. Po uvolnění prozánětlivých mediátorů (jako např. IL - 1 $\beta$  a TNF -  $\alpha$ ) aktivuje zánětlivou odpověď, zesiluje aterosklerotické procesy a zvyšuje aktivitu a migraci monocytů / makrofágů. Navíc je považován za silný prediktor kardiovaskulární a všeobecné mortality u hemodialyzovaných nemocných [Kim JK et al. 2012].

HMGB - 1 (30 kDa) [Wang H, 2004] je přítomen v jádrech většiny eukaryotických buněk. Extracelulárně je uvolňován pasivně při buněčném poškození, nekróze a apoptóze, nebo aktivně po stimulaci v přítomnosti zánětu a pak se chová jako mediátor zánětu [Sims GP, 2010].

## 1.5 Markery peritoneální homeostázy

In vitro experimenty dokázaly, že GDP mají škodlivý efekt na lidské peritoneální mezenchymální buňky díky over - expresi RAGE a díky zvýšené produkci VEGF, čímž podporují epitel - mezenchymální přeměnu peritonea. (VEGF je produkován řadou buněk a stimuluje aktivitu syntázy oxidu dusnatého, vaskulární permeabilitu a angiogenezi.) Produkce VEGF v peritoneálním endotelu narůstá s dobou na PD a je spojena s nárůstem vaskulární hustoty. Zvýšené dialyzátové hladiny VEGF jsou spojeny se zvýšenou propustností peritonea pro makromolekuly a rozpuštěné látky, což je odpovědí na nárůst peritoneálního vaskulárního povrchu. Produkce VEGF peritoneálními mezenchymálními buňkami je stimulována prozánětlivými cytokiny a AGEs. Proto byla předpokládána lepší peritoneální integrita při použití PD roztoků s nízkou zátěží GDP, která je nepřímo podporována zvýšenými hladinami cancer antigen 125 (CA 125) a sníženými hladinami hyaluronanu pozorovanými v dialyzátech. Hyaluronan je tvořen mezoteliálními buňkami a moduluje intraperitoneální inflamaci indukcí uvolňování cytokinů a chemokinů a ovlivňuje diferenciaci a proliferaci buněk. Takže jeho snížené hladiny by pak mohly odrážet sníženou intraperitoneální inflamaci danou působením PD roztoku [Weiss L et al. 2009].

Mezoteliální buňky produkují TNF -  $\alpha$ , IL - 6, IL - 8 a hepatocytární růstový faktor (HGF). Peritoneální makrofágy a adipocyty syntetizují IL - 6, peritoneální fibroblasty a makrofágy syntetizují IL - 8 a migraci makrofágů inhibující faktor (MIF). TNF -  $\alpha$  a IL - 6 působí prozánětlivě, MIF a IL - 8 chemotakticky. V kontrastu pak HGF zmírňuje EMT přeměnu peritonea indukovanou vysokým obsahem glukózy v PD roztoku. Leptin a adiponektin jsou adipokiny s pro - aterogenní a anti - aterogenní vlastností, přičemž adiponektin navíc stimuluje produkci protizánětlivých interleukinů IL - 1 a IL - 10 tvořených makrofágy. Syntéza leptinu v peritoneálních adipocytech je zvyšována přítomností glukózy. U nemocných bez CKD je hyperleptinémie a hypoadiponektinémie spojena se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem. U nemocných na PD je poměr leptin / adiponektin výrazně zvýšen, což je spojováno se zvýšeným počtem kardiovaskulárních komplikací.

U pacientů užívajících konvenční PD roztoky byly pozorovány vyšší sérové hladiny cytokinů TNF -  $\alpha$ , leptinu a lipokalinu - 2 (NGAL) (protein nacházející se v neutrofilech, ale i např. v renálních tubulech, jeho produkce odráží ischemické a nefrotoxické poškození) a nižší hladiny adiponektinu. V dialyzátu pak byly pozorovány vyšší hladiny IL - 1, IL - 8 a leptinu. Poměr hladin D / P pro TNF -  $\alpha$ , HGF, MIF, IL - 8, IL - 1, CRP a leptin naznačuje, že peritoneální dutina je hlavním místem syntézy těchto mediátorů v důsledku chronického působení dialyzátu s nízkou biokompatibilitou. Nepřítomnost nepřímé úměry mezi D / P jejich

hladin, a vzhledem k molekulovým hmotnostem mediátorů, podporuje hypotézu, že vysoké koncentrace mediátorů v effluentu jsou výsledkem významné intraperitoneální syntézy a nejsou ovlivněné selektivním peritoneálním transportem. Při používání PD roztoků s nízkou zátěží GDP pak byly pozorovány nižší plazmatické a dialyzátové hladiny leptinu a IL - 8 a vyšší plazmatické a dialyzátové hladiny adiponektinu [Lai KN et al. 2012].

Při vyvíjení biokompatibilních PD roztoků byl očekáván pozitivní vliv na prodloužení životnosti peritoneální membrány díky neutrálnímu pH a redukovanému obsahu GDP s následnou nižší tvorbou AGEs u bikarbonátových roztoků. Od biokompatibilních PD roztoků bylo očekáváno snížení incidence peritonitid, delší uchování reziduální renální funkce (RRF) a lepší ochrana peritonea s oddálením selhání jeho funkce jako dialyzační membrány [Qayyum A et al. 2015].

V prospektivních studiích bylo u bikarbonátových roztoků pozorováno delší zachování diurézy ve srovnání s laktátovým roztokem. Nelišila se clearance urey ani kreatininu, ale u bikarbonátového roztoku byla pozorována nižší ultrafiltrace a intraperitoneálně stabilní pH v průběhu výměny [Montenegro J et al. 2006; Fang W et al. 2008]. Při zkoumání vlivu biokompatibilních roztoků na zachování RRF, které je spojeno s lepším přežíváním pacientů léčených PD, byl pozorován pozitivní vliv léčby bikarbonátovými roztoky, kdy při 12 měsíční léčbě nebyl pozorován signifikantní pokles RRF ve srovnání s konvenčními roztoky. Navíc u pacientů se vstupní RRF  $\geq 2$  ml/min /1,73 m<sup>2</sup> bylo po 12 měsících pozorováno signifikantní zvýšení RRF. Pozitivní vliv bikarbonátového roztoku na peritoneum, a tím i míra biokompatibility, byl navíc posílen signifikantním zvýšením pozorovaných hladin CA 125 v dialyzátu, který je považován za marker mezoteliální masy. Mezi oběma roztoky byl pozorován signifikantní rozdíl v poměru kreatininu mezi dialyzátem a plazmou (D / P kreatinin), který byl u bikarbonátového roztoku vyšší [Kim S et al. 2009]. Byla pozorována pozitivní korelace mezi CA 125 a D / P kreatininu, což bylo vysvětlováno jako iniciální korelace mezoteliální masy s povrchem peritonea [Fusshöller A, 2003], přičemž D / P kreatininu nezávisí na ploše peritonea, ale odráží peritoneální propustnost.

Při srovnávání icodextrinového a aminokyselinového roztoku byl pozorován signifikantní nárůst CRP u icodextrinu a nárůst hladiny CA 125 u aminokyselin [Martikainen TA et al. 2005]. V jiné dlouhodobé studii (5 let probíhající PD) nebyla prokázána souvislost mezi rychlostí poklesu hladiny CA 125 v dialyzátu s mírou expozice peritonea glukóze. Signifikantní pokles hladiny CA 125 a jeho appearance byl dáván do souvislosti s buněčnou mezoteliální masou [Candan C et al. 2011].

Vstupní nadšení z biokompatibilních roztoků bylo pochopitelné, ale kromě pozorovaných zvýšených dialyzátových hladin CA 125 byl také pozorován nárůst D / P kreatininu, což znamená zvýšení transportu a snížení ultrafiltrace, které bývá následkem vazodilatace submezoteliálních cév při inflamaci. Avšak následující studie prokázaly, že zvýšení D / P kreatininu je dočasné a z dlouhodobého hlediska je funkce peritonea déle udržena. Proti pozitivnímu významu zvýšené hladiny CA 125 pak hovoří i to, že byl pozorován i nárůst hladiny zánětlivých markerů CRP a IL-6 [Martikainen TA et al. 2005].



## 1.6 Role CA 125 ve vztahu k mezoteliálním buňkám při posuzování biokompatibility PD roztoků

CA 125 je glykoprotein o vysoké molekulové hmotnosti (220 kDa) vytvářený jak buňkami coelomového (perikardiální, pleurální a peritoneální), tak mülleriánského (tubální, endometriální a endocervikální) epitelu a je hlavně používán u žen s diagnostikovaným ovariálním karcinomem jako biomarker monitorování responze na léčbu [Buys SS et al. 2011].

CA 125 je také vytvářen lidskými peritoneálními mezoteliálními buňkami [Zeimet AG et al. 1997]. Po sérii in vitro a klinických studií byl CA 125 navržen jako marker mezoteliální masy a / nebo obratu mezoteliálních buněk u stabilních PD pacientů. Hladina CA 125 v dialyzátu byla stanovována v effluentu po noční výměně [Visser CE et al. 1995], Krediet pak navrhl standardizovat měření a stanovovat hladinu CA 125 na konci 4. hodiny peritoneálního ekvilibračního testu (PET) a výsledek vyjádřit jako appearance rate CA 125 v dialyzátu [Krediet RT, 2001]. Teorie o markeru mezoteliální masy zůstala v následující dekádě v podstatě nezměněná a CA 125 se stal jakýmsi „zlatým standardem“ odhadování masy mezoteliálních buněk v peritoneu při PD a především a hlavně markerem stupně biokompatibility PD roztoků druhé generace [Jones S et al. 2001; Haas S et al. 2003; Williams JD et al. 2004; Szeto CC et al. 2007; Theodoridis M et al. 2008]. Skutečnost, že CA 125 v dialyzátu nemusí být pouze produktem zdravých mezoteliálních buněk, ale že může pocházet i z odloučených, nekrotizovaných mezotelií, si až na výjimky nikdo nepřipouštěl, i když Visser již ve své studii popisovala přítomnost CA 125 v mezoteliích intracelulárně a zamýšlela se nad možným ovlivněním dialyzátové hladiny CA 125 vyplavením těchto zásob při zvýšené mezoteliální buněčné smrti např. při peritonitidě [Visser CE et al. 1995].

Lai a spol. byl první, kdo poukázal na chybějící korelaci mezi hladinami CA 125 a počtem mezoteliálních buněk v dialyzátu. Ve své cross - sectional studii použil dialyzát z 8 hodinové noční výměny s obsahem glukózy 1,36 %. Suspenzi buněk získaných z dialyzátu obarvil trypanovou modří a odlišil tak mrtvé buňky, které se nezbarvovaly. Populace buněk pak byla vyšetřována jak průtokovou cytometrií, tak morfologicky. Mezotelie tvořily průměrně 4,4 % buněčné populace. Celkově bylo pozorováno 4,9 % mrtvých buněk v buněčné populaci a objem mrtvých buněk mezi mezoteliemi byl signifikantně vyšší ve srovnání s celou buněčnou populací. Nebyla pozorována korelace mezi hladinami CA 125 a počtem mezotelií, hladiny CA 125 nebyly ovlivněny ani anamnézou předchozí peritonitidy, ale u pacientů bez anamnézy peritonitidy byly pozorovány vyšší počty mezoteliálních buněk. Výsledkem studie bylo, že mezoteliální buňky v dialyzátu spíše odrážejí počty odloučených poškozených buněk

peritonea než masu zdravé populace mezotelií [Lai KN et al. 1997].

Na tuto studii navázal Breborowicz s použitím in vitro kultur lidských mezoteliálních buněk peritonea, kdy popřel vztah mezi počtem mezoteliálních buněk a hladinou CA 125 uvolňovanou z jejich cytosolu. Nepozoroval žádnou korelaci mezi počtem buněk a množstvím CA 125 uvolňovaným v průběhu inkubace, avšak pozoroval korelaci mezi množstvím uvolněného CA 125 a věkem dárců. Při dlouhodobé (4 týdenní) expozici vysoké koncentraci glukózy (45 mmol) poklesl počet mezoteliálních buněk, stejně jako množství CA 125 v cytosolu i uvolněného do media. Při expozici mezotelií zánětlivým cytokinům (TNF -  $\alpha$ , IL - 1 $\beta$ , INF -  $\gamma$ ) v tkáňové kultuře, stejně jako Visser [Visser CE et al. 1995], nepozoroval zvýšení hladiny CA 125 [Breborowicz A et al. 2005].

Naproti tomu však Zeimet zvýšené uvolňování CA 125 z mezoteliálních buněk pod vlivem prozánětlivých cytokinů (IL - 1 $\beta$ , TNF -  $\alpha$ , IFN -  $\gamma$ ) pozoroval [Zeimet AG et al. 1997]. Stejně jako Zeillemaker, který izoloval mezotelie z omenta a kultivoval je jako souvislou jednovrstevnou membránu a pozoroval uvolňování CA 125 z apikální a bazální strany membrány. Pozoroval uvolňování CA 125 preferenčně z apikální strany (v in vitro modelu odpovídající straně peritonea obráceného do peritoneální dutiny), které se objevovalo u neaktivizovaných kultur samovolně a srovnával je s chováním mezotelií po stimulaci rekombinantním IL - 1 $\beta$  (rIL - 1 $\beta$ ), TNF -  $\alpha$  a lipopolysacharidem z E. coli. Pozoroval přetrvávající preferenci produkce CA 125 z apikální strany membrány, bez ohledu na stranu působícího stimulu, a navíc pozoroval signifikantní zvýšení hladiny CA 125 při působení rIL - 1 $\beta$ , TNF -  $\alpha$  a E. coli lipopolysacharidu [Zeillemaker AM et al. 1994].

Koomen sloučil in vivo a in vitro pozorování, když vyšetřoval poměr hladiny CA 125 v dialyzátu a plazmě, aby dokázal, že CA 125 je produkováno lokálně a jeho hladiny v dialyzátu nejsou výsledkem transperitoneálního transportu z cirkulace. Vyšetřoval vzorky dialyzátu z noční výměny a pozoroval pozitivní korelaci mezi počtem mezoteliálních buněk a koncentrací CA 125 v dialyzátu. In vitro pak zkoumal jednak mezotelie získané z dialyzátu a jednak mezotelie získané přímo z omenta. U různě získaných vzorků pak shodně pozoroval lineární nárůst hladiny CA 125 v čase během inkubace a při rozdělení vzorků dle definovaného počtu mezotelií pak lineárně korelovala produkce CA 125 s počtem buněk měřená za 48 hodin. Studií dokázal, že v tkáňových kulturách jsou dialyzátové hladiny CA 125 produkovány přímo mezoteliálními buňkami peritonea a že při pozitivní korelaci počtu mezotelií a hladiny CA 125 pak hladiny CA 125 reflektují mezoteliální masu peritonea [Koomen GC et al. 1994].

Ale je otázkou, zdali je tento experimentální model přenositelný do klinické praxe, kde se v in vivo studiích objevuje mnohem více faktorů ovlivňujících hladiny CA 125 v dialyzátu než pouhé zmnožení masy mezotelí a navíc, když se v klinických studiích stanovují již jen hladiny CA 125 bez měření počtu mezotelí v dialyzátu. Během peritonitidy bylo pozorováno přechodné, až trojnásobné zvýšení hladiny CA 125 v dialyzátu ve srovnání s klinicky stabilním stavem. Hladiny CA 125 měřené 2 týdny po ukončení léčby peritonitidy pak odpovídaly hladinám stabilních pacientů [Pannekeet MM et al. 1995; Turhan P et al. 2005]. Systémové zvýšení hladiny CA 125 bývá pozorováno i v jiných situacích, než pouze při karcinomu ovaria. Zvýšené hladiny CA 125 mohou predikovat zvýšené riziko úmrtí na rakovinu plic a na metabolická onemocnění a onemocnění trávicího traktu [Terada KY et al. 2014].

Byly pozorovány změny sérových hladin CA 125 u 373 pacientů s různými onemocněními jater a antigen byl měřen jak v séru, tak v ascitu. Hlavním faktorem ovlivňujícím jeho sérové koncentrace byla přítomnost ascitu, kdy 94 % pacientů s ascitem mělo patologické hodnoty CA 125 (ve srovnání se 40 % pacientů bez ascitu). Signifikantně vyšší hladiny CA 125 v ascitu pak byly hlavně spojeny se spontánní bakteriální peritonitidou. Sérové koncentrace CA 125 klesaly v souvislosti s paracentézou. CA 125 proto není vnímán jako tkáňově specifický marker a hlavním zdrojem jeho falešné positivity v séru je ascites spojený s jaterní cirhózou [Molina R et al. 1991]. Ke zvýšení sérového CA 125 dochází i u nemocných se srdečním selháním, kde hodnota CA 125 > 60 kU/l identifikuje pacienty se srdečním selháním s vyšším rizikem úmrtí a má přídatnou prognostickou hodnotu ke koncentraci NT - pro - BNP. Mechanismus, jakým dochází k uvolňování CA 125, není přesně znám, ale vzhledem k jeho dobré korelaci s hladinami natriuretických peptidů nejspíše souvisí se zvýšením end - diastolického tlaku v levé komoře srdeční a vyšší funkční třídou NYHA klasifikace [Méndez AB et al. 2014]. I v další studii byl prokázán vztah mezi zvýšením CA 125 a strukturálními a funkčními kardiologickými proměnnými, např. sníženou tloušťkou stěny levé komory srdeční, ejekční frakcí levé komory srdeční, větším end - diastolickým a systolickým průměrem levé komory srdeční a vyšší hladinou pro - BNP [Yilmaz H et al. 2014]. Přítomnost tekutiny v serózních dutinách nejspíš stimuluje uvolňování CA 125, protože je spojována s vyššími sérovými hladinami CA 125, což potvrdil i Turk a spol., který zkoumal hladiny CA 125 u pacientů s chronickým srdečním selháním v souvislosti s přítomností či nepřítomností pleurálního výpotku a pozoroval signifikantní zvýšení hladin CA 125 u nemocných s výpotkem ve srovnání s nemocnými bez výpotku [Turk HM et al. 2003].

## 1.7 CA 125 u PD pacientů – systémové hladiny

Přestože ledviny zřejmě nejsou hlavní cestou eliminace CA 125 z organismu a přestože Menzin u jinak zdravých, hemodialyzovaných patientek nezaznamenal zvýšené sérové koncentrace CA 125 [Menzin AW et al. 1995], dochází při poruše funkce ledvin ke zvýšení CA 125, které není kompenzováno po zahájení peritoneální dialýzy. Stejně tak Camci pozoroval u PD pacientů zvýšené hladiny sérového CA 125, které ale nekorelovaly s dobou trvání PD jako náhrady funkce ledvin a neměnily se v závislosti na přítomnosti, či nepřítomnosti dialyzátu v peritoneální dutině [Camci C et al. 2002]. Elevace CA 125 byla pozorována i u nefrotického syndromu [Kilis-Pstrusinska K, 2013].

U PD pacientů bylo laparoskopické nebo punkční založení PD katétru zvažováno jako možný faktor ovlivňující sérové hladiny CA 125. Tyto spekulace vyvrátil Pasqual, který sledoval pacienty po chirurgických operacích zahrnujících intraperitoneální manipulaci a rozdělil je podle délky výkonu a rozsahu laparotomie. U pacientů po krátkém výkonu nezaznamenal signifikantní změny v hladinách CA 125, které pozoroval u dalších 2 skupin nemocných po středně dlouhé a dlouhé nitrobřišní operaci [Pasqual E et al. 2011]. Proto můžeme s jistotou tvrdit, že ani laparoskopické zavedení PD katétru systémovou hladinu CA 125 neovlivňuje. Naopak ke zvýšení sérové hladiny CA 125 dochází při zánětlivých stavech, protože byla prokázána korelace hladiny CA 125 s proteiny akutní fáze (CRP, albumin) [Yilmaz H et al. 2014].

Zůstává tedy otázkou, na kolik je CA 125 spolehlivým markerem masy mezoteliálních buněk při existenci různých faktorů ovlivňujících hladiny CA 125 prokázaných v in vitro i in vivo studiích.

## 2 PŮVODNÍ PRÁCE

Tato dizertační práce vychází ze souboru původních klinických prací a přehledového článku, jejichž výčet následuje:

**Studie 1** – Peritoneální dialýza s nízkou zátěží GDP příznivě ovlivňuje plazmatické hladiny prozánětlivých ligand receptoru pro AGEs

**Opatrná S, Pöpperlová A,** Kalousová M, Zima T. *Low glucose degradation product peritoneal dialysis regimen is associated with lower plasma EN-RAGE and HMGB-1 proinflammatory ligands of receptor for advanced glycation end products.* Ther Apher Dial. 2014 Jun; 18(3):309-16.

**Pöpperlová A, Opatrná S,** Kalousová M, Zima T. *Solubilní receptor pro AGEs a jeho proinflamatorní ligandy EN-RAGE a HMGB-1 u peritoneálně dialyzovaných nemocných.* Aktuality v nefrologii. 2014, roč. 20, č. 1, s. 8-12. ISSN: 1210-955X; 1213-3248.

**Studie 2** – Vliv icodextrinu a glukózového bikarbonát/laktátového roztoku na populaci buněk v dialyzátu a markery biokompatibility IL-6 a CA 125 u incidentních PD pacientů

**Opatrná S., Pöpperlová A.,** Lysák D., Fuchsová R., Trefil L., Racek J., Topolčan O. *Effects of icodextrin and glucose bicarbonate/lactate-buffered peritoneal dialysis fluids on effluent cell population and biocompatibility markers IL-6 and CA125 in incident peritoneal dialysis patients.* In print. Ther Apher Dial.

**Pöpperlová A.** *Jaké faktory ovlivňují hladiny CA 125 v séru a v dialyzátu?* Review. Aktuality v nefrologii. 2015, roč. 21, č. 1, s. 14-15. ISSN: 1210-955X; 1213-3248.

### **Další publikace:**

**Pöpperlová A.,** Reischig T. *Renální insuficience na podkladě sarkoidózy.* Postgraduální nefrologie. 2012, roč. 10, č. 5-6, s. 78-80. ISSN: 1214-178X.

### **3 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE**

1. Porovnat plazmatické hladiny s - RAGE, EN - RAGE a HMGB - 1 mezi skupinami pacientů léčených různým PD režimem s rozdílnou zátěží GDP a ozřejmit vztah s - RAGE a jeho ligand k dalším laboratorním a klinickým ukazatelům
2. Porovnat plazmatické hladiny s - RAGE a jeho ligand mezi PD pacienty, CKD nemocnými a zdravými dobrovolníky a ozřejmit tak vliv různého stupně renální dysfunkce na jejich hladiny
3. Posoudit vliv icodextrinového roztoku na změny buněčné populace v dialyzátu a posoudit vztah těchto změn s hladinami CA 125 a IL – 6 v dialyzátu
4. Posoudit vliv aktivované intraperitoneální inflamace na systémové markery zánětu

#### **4 SOUBOR NEMOCNÝCH A METODIKA**

Studijní protokol byl schválen lokální etickou komisí a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas před zařazením do studie. Všichni sledovaní nemocní byli v klinicky stabilním stavu, bez autoimunitního a nádorového onemocnění a bez systémové infekce. Všichni byli minimálně jeden měsíc po odléčení případné epizody peritonitidy.

## **4.1 Studie 1 - Peritoneální dialýza s nízkou zátěží GDP příznivě ovlivňuje plazmatické hladiny prozánětlivých ligand receptoru pro AGEs**

### **Design studie**

Studie byla navržena jako observační, prospektivní.

#### **4.1.1 Soubor nemocných a základní klinická data**

Bylo vyšetřeno celkem 33 PD pacientů, z toho 20 mužů, průměrný věk 59 (20 - 84) let, doba léčby PD 8 (2 - 83) měsíců. Body mass index (BMI) byl 26,1 (17,5 - 43), RRf 6,84 (0 - 15,35) ml/min, Kt/V 2,06 (1,18 - 2,72), D / P kreatininu ve 4. hodině PET 0,7 (0,4 - 0,91). PD pacienti byly rozděleni do 3 skupin dle preskripce.

Podskupina P sestávala z 16 pacientů [8 mužů, ve věku 50 (20 - 72) let, léčba PD 7,5 (2 - 22) měsíců], kteří byli léčeni pouze glukózo – bikarbonát / laktátovým PD roztokem (Physioneal® Baxter Healthcare S. A., Castlebar, Ireland).

Dalších 9 pacientů [7 mužů, ve věku 63 (38 - 84) let, na PD 13 (3 - 18) měsíců] pak užívalo tento roztok pouze pro denní výměny a icodextrinový PD roztok na noční výměnu (Extraneal® Baxter Healthcare S. A., Castlebar, Ireland), podskupina E.

Poslední skupinu D tvořilo 8 pacientů [5 mužů, ve věku 61 (44 - 71) let, na PD 17 (2 - 83) měsíců], kteří byli léčeni glukózo - laktátovým PD roztokem (Dianeal® Baxter Healthcare S. A., Castlebar, Ireland).

Příčinou vedoucí k renálnímu selhání byl diabetes mellitus u 10 pacientů, chronická intersticiální nefritida u 7 pacientů, chronická glomerulonefritida u 8 pacientů, hypertenzní nefroskleróza u 4 pacientů, polycystická choroba ledvin u 2 pacientů, u jednoho pacienta retroperitoneální fibróza a u jednoho pak oboustranná nefrektomie pro renální karcinom.

Skupina zdravých dobrovolníků (HV) sestávala z 16 mužů a 4 žen, ve věku 41,5 (23 - 56) let, BMI bylo 25,3 (20,15 - 38,09) a GFR 1,76 (1,29 - 3,51) ml/s.

Dále bylo vyšetřeno celkem 20 pacientů s CKD, z toho 13 mužů, ve věku 70 (39 - 81) let, s BMI 27,3 (20,2 - 36,23) a GFR 0,35 (0,16 - 0,66) ml/s. Příčinou renálního selhání u CKD byla diabetická nefropatie v 7 případech.



#### 4.1.2 Metodika

Noc před studijním odběrem si pacienti ve 22 hodin napustili PD roztok, který byl vypuštěn do ledové tříště po celonoční 10 hodinové výměně další den ráno v 8 hodin v PD ambulanci. Effluent byl centrifugován v 500 ml kónických zkumavkách po dobu 35 minut při 10 °C a 3000 otáčkách/min. Supernatant pak byl uchováván v 1.8 NUNcCryo zkumavkách (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a zmražen na - 80 °C až do analýzy. V době odběru PD roztoku byly také nalačno odebírány i krevní vzorky. Vzorky plazmy byly uchovávány zmrazené na - 80 °C do doby analýzy. Peritoneální ekvilibrační testy byly prováděny pomocí softwaru PD Adequest dle instrukcí výrobce (Baxter Healthcare, McGaw Park, IL, USA). Peritoneální clearance byla vypočtena pomocí vzorce  $pCl = (Cd * Vd) / Cs$ , kde Cd znamená koncentraci v dialyzátu, Vd znamená objem dialyzátu po celonoční výměně (ml / 600 min) a Cs je sérová koncentrace.

C - reaktivní protein (CRP) byl stanovován imunoturbidimetricky (K-Assay; Kamiya Biomedical, Seattle, Washington, USA - esej s nižší sensitivitou). s - RAGE, EN - RAGE a HMGB - 1 byly měřeny pomocí standardních ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) kitů dle protokolu výrobce: s - RAGE (Quantikine, RD Systems, Minneapolis, MN, USA, [www.rndsystems.com](http://www.rndsystems.com) ), EN - RAGE (Circulex™, CycLex Co. Ltd., Nagano, Japan, [www.cyclex.co.jp](http://www.cyclex.co.jp) ), HMGB - 1 (IBL International, Hamburg, Germany, [www.ibl-international.com](http://www.ibl-international.com)).

#### 4.1.3 Statistická analýza

Získaná data byla statisticky zpracována pomocí softwaru Sigma Stat 3.5 (Dundas Software GmbH, Spolková republika Německo). Výsledky jsou uváděny jako medián a (range). Rozdíly mezi sledovanými skupinami byly testovány pomocí Kruskal - Wallisova a Wilcoxonova testu a korelace byly testovány pomocí Spearmanova testu. Výsledky byly považovány za statisticky významné při hladině významnosti  $p < 0,05$ .

## **4.2 Studie 2 - Efekt icodextrinu a glukózového bikarbonát/laktátového roztoku na populaci buněk v dialyzátu a markery biokompatibility IL-6 a CA 125 u incidentních PD pacientů**

### **Design studie**

Studie byla navržena jako observační, prospektivní a byli zařazováni pacienti 3 týdny po založení PD katétru. Nikdo z pacientů nebyl léčen N - acetylcysteinem, o kterém je známo, že u PD pacientů snižuje plazmatické hladiny IL - 6 [Nascimento MM et al. 2010].

### **4.2.1 Soubor nemocných a základní klinická data**

CAPD byla zahájena 4 denními výměnami o objemu 1500 – 2000 ml s glukózo - bikarbonát / laktátovým PD roztokem (Physioneal ®, Baxter Healthcare, Castlebar, Ireland). Další den byla měřena UF po 4 hodinové výměně s použitím P roztoku o koncentraci glukózy 2,27 %. Pokud byla UF po této výměně větší než 400 ml, pacienti byli zařazeni do skupiny P s preskripcí pouze P roztoků, ostatním byla navíc předepsána noční výměna s icodextrinovým PD roztokem (Extraneal ®, Baxter Healthcare, Castlebar, Ireland) a byli zařazeni do skupiny E.

Skupina P sestávala z 8 pacientů [6 mužů, ve věku 55 (40 - 73) let]. Příčinou vedoucí k renálnímu selhání byl diabetes mellitus u 2 pacientů, chronická glomerulonefritida u 3 pacientů a pak vždy u 1 pacienta polycystická choroba ledvin, nefroskleróza a mnohočetný myelom.

Skupina E sestávala z 11 pacientů [4 muži, ve věku 60 (33 - 77) let]. Příčinou vedoucí k renálnímu selhání byl diabetes mellitus u 4 pacientů, chronická glomerulonefritida u 4 pacientů a pak vždy u 1 pacienta nefroskleróza, refluxní nefropatie a tubulointersticiální nefritida. Ve skupině P bylo BMI 28,7 (20,8 – 38,6), tělesný povrch (BSA) 1,88 (1,68 – 2,09) m<sup>2</sup>. Ve skupině E bylo BMI 24,77 (19,14 – 35,99) a BSA 1,74 (1,49 – 2,13) m<sup>2</sup>.

#### 4.2.2 Metodika

Před založením PD katétru (čas 0) byl odebrán krevní vzorek, byla oddělena plazma a ta byla uchována zmražená při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analýzy. V čase 1, 6 a 12 měsíců trvajících CAPD byl proveden peritoneální ekvilibrační test pomocí softwaru PD Adequest dle instrukcí výrobce (Baxter Healthcare, McGaw Park, IL, USA). Ve stejný den byl také odebrán k dalšímu zpracování effluent (viz metodika studie 1).

Základní biochemické parametry byly stanovovány za použití standardních laboratorních technik. CRP bylo stanovováno imunoturbidimetricky (K-Assay; Kamiya Biomedical, Seattle, Washington, USA; detekční limit 1 mg/l, fyziologické rozmezí 1 – 10 mg/l - esej s nižší senzitivitou).

K identifikaci různých buněčných typů v dialyzátu a k vyjádření jejich exprese byla použita průtoková cytometrie. 100  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze bylo inkubováno s koktejlem fluorescenčně značených monoklonálních protilátek [CD45-Krome Orange, HLA – DR - PE (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA); CD 14 - PECy7 (Becton Dickinson, New Jersey, USA); cytokeratin - APC (Exbio, Vestec, Czech Republic); IL - 6R - PE (Biolegend, San Diego, CA, USA)]. Zastoupení makrofágů (buňky CD45+ / CD14+), lymfocytů (buňky CD45+ / CD14-), mezoteliálních buněk (buňky CD45- / cytokeratin+) a granulocytů (buňky CD45+ / CD14-) bylo stanovováno pomocí kombinace parametrů buněčné zrnitosti (SS) a průměru (FS). Buňky byly inkubovány 15 minut v temnu za pokojové teploty. Vzorky byly lyzovány 10 minut pomocí BD FACS™ Lysing Solution. Nenavázané protilátky a zbylé fragmenty erytrocytů byly vymyty pomocí fyziologického roztoku pufovaného fosfátem (PBS) a centrifugovány. Nakonec byly buňky rozpuštěny v 500  $\mu\text{l}$  PBS. Všechny popsané kroky proběhly za využití BD FACS™ Lyse Wash Assistant (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

U makrofágů a mezoteliálních buněk byla hodnocena exprese markerů aktivovaných zánětem (HLA - DR a IL6 - R). Výsledky byly vydány jako procento pozitivních buněk a fluorescenční intenzita měřená jednotkami MESF (Molecules of Soluble Fluorochrome) (Quantum R - PE MESF, Bangs Laboratories, Indiana, USA). Stanovení fluorescenční intenzity udávané v MESF jednotkách je prováděno přímým srovnáním fluorescenčního měření ze série čtyř fluorescenčních populací mikrokuliček značených s různým množstvím phycoerythrinu se značenými buňkami. Ke stanovení exprese HLA - DR a IL6 - R u zkoumaných buněk byla použita QuickCal® analyzační šablona a analýzy byly provedeny na průtokovém cytometru FACS Canto™ II. Přístroj byl denně standardizován pro fluorescenci a vyrovnání rozptylu světla s použitím BD™ Cytometer Setup & Tracking beads

(Becton Dickinson, New Jersey, USA). Data o min. 20 000 buňkách byly shromažďovány v souborech a analyzovány pomocí softwaru DIVA 6.0 (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

Plazmatické a dialyzátové hladiny IL – 6 byly stanovovány pomocí ELISA kitů (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA), minimální detekovatelná koncentrace byla 7 pg/ml, intra - a inter - esežové odchylky byly 2,7 a 4,5 %. Hladiny CA 125 byly stanovovány automatizovanou chemiluminescenční mikročasticovou imunoeseží (Architect i1000SR device, Abbott, Wiesbaden, Spolková republika Německo), rozmezí měření je 1 – 1000 kIU/l, kalibrační rozmezí je 0 – 1000 kIU/l, intra - a inter - esežová odchylka 2,9 a 4,9 %, referenční mez je pak 0 – 35 kIU/l.

Appearance rate (AR) IL - 6 a CA 125 v dialyzátu byla vypočtena jako dialyzátová koncentrace vynásobená objemem dialyzátu a to vše vydělené časem trvající výměny v minutách. [AR = (Cd \* Vd) / čas výměny]

#### **4.2.3 Statistická analýza**

Získaná data byla statisticky zpracována pomocí softwaru Sigma Stat 3.5 (Dundas Software GmbH, Spolková republika Německo). Výsledky jsou uváděny jako medián a (range). Rozdíly mezi sledovanými skupinami byly srovnávány pomocí Mann – Whitney Rank Sum testu, data v různých časových intervalech v jednotlivých skupinách byly porovnávány za použití testu One Way Repeated Measures Analysis of Variance. Korelace výsledků mezi skupinami byla testována pomocí Spearmanova testu. Výsledky byly považovány za statisticky významné při hladině významnosti  $p < 0,05$ .

## 5 ŘEŠENÍ A VÝSLEDKY VÝZKUMU

### 5.1 Studie 1

PD pacienti vykazovali vyšší plazmatické hladiny s - RAGE ( $p < 0,001$ ) (graf 1) a nižší hladiny HMGB - 1 ve srovnání s HV ( $p < 0,05$ ) (graf 2) a nižší hladiny EN - RAGE ve srovnání s CKD ( $p < 0,05$ ) (graf 3). U PD pacientů byly pozorovány nižší hladiny albuminu ve srovnání se skupinou HV a CKD ( $p < 0,05$  pro oba vztahy) (tabulka 2).

#### 5.1.1 PD pacienti

V rámci skupiny PD pacientů byl prokázán vztah mezi hladinami s - RAGE a albuminu ( $r = - 0,367$ ,  $p < 0,05$ ), D / P kreatininu ( $r = 0,408$ ,  $p < 0,05$ ) a Kt/V ( $r = 0,487$ ,  $p < 0,01$ ). Hladiny EN - RAGE pak korelovaly s CRP ( $r = 0,440$ ,  $p < 0,05$ ) a BMI ( $r = 0,552$ ,  $p < 0,01$ ). U hladin HMGB - 1 byla pozorována korelace s BMI ( $r = 0,364$ ,  $p < 0,05$ ) a CRP ( $r = 0,685$ ,  $p < 0,0001$ ) a s hladinami EN - RAGE ( $r = 0,551$ ,  $p < 0,01$ ). Pacienti s vyšším / rychlejším peritoneálním transportem (D / P kreatinin  $> 0,65$ ) vykazovali trend k vyšším plazmatickým koncentracím s - RAGE ve srovnání s pacienty s nízkým / pomalým peritoneálním transportem [2,3 (1,5 - 6,4) vs 1,8 (1,1 - 5) ng/ml;  $p = 0,056$ ]. Podskupina PD pacientů s CRP vyšším než medián vykazovala vyšší plazmatické hladiny HMGB - 1 (ng/ml) [1,7 (0,8 - 4,9) vs 1,4 (0,7 - 2,9)] a EN - RAGE (ng/ml) [43,1 (8,8 - 112,5) vs 27,7 (0 - 194)],  $p < 0,05$  pro oba prozánětlivé ligandy.

Skupina D, tedy skupina pacientů vystavená největší intraperitoneální zátěži GDP, vykazovala signifikantně vyšší plazmatické hladiny EN - RAGE ( $p < 0,001$  pro oba vztahy) a HMGB - 1 ( $p < 0,01$  pro oba vztahy) než skupina E a P (graf 4,5). Plazmatické hladiny s - RAGE, stejně jako albuminu, CRP, Kt / V a RRF se mezi jednotlivými PD podskupinami nelišily (tabulka 3,4).

V effluentu z noční výměny se hladiny s - RAGE a jeho ligandů mezi jednotlivými PD skupinami nelišily. D / P poměr pro s - RAGE byl 0,028 ve skupině E, 0,022 ve skupině D a 0,025 u P pacientů. Mezi plazmatickými a dialyzátovými hladinami s - RAGE byla pozorována těsná pozitivní korelace ve všech třech PD skupinách (D -  $r = 0,96$ ,  $p < 0,001$ ; E -  $r = 0,93$ ,  $p < 0,001$ ; P -  $r = 0,62$ ,  $p < 0,05$ ). D / P poměr pro EN - RAGE byl 0,057 ve skupině E, 0,015 ve skupině D a 0,021 ve skupině P, zatímco pro HMGB - 1 byl D / P poměr 1,83 pro E, 1,25 pro D a 1,3 pro P. Mezi plazmatickými a dialyzátovými hladinami EN - RAGE a HMGB - 1 nebyl pozorován vztah u žádné ze sledovaných skupin PD.

Peritoneální clearance s - RAGE a EN - RAGE byla vyšší ve skupině E ve srovnání se skupinami D a P. Jak jsme očekávali, pacienti léčení v E režimu byli starší, vykazovali vyšší D / P kreatinin (tabulka 3) a větší objem vypuštěného dialyzátu ve srovnání se skupinou D a P.

### **5.1.2 CKD a HV**

U CKD pacientů korelovalo BMI s hladinami HMGB - 1 ( $r = 0,559$ ,  $p < 0,05$ ), korelace s hladinami s - RAGE ( $p = 0,064$ ) a EN - RAGE ( $p = 0,08$ ) nedosahovala statistické významnosti. Hodnoty GFR korelovaly s hladinami s - RAGE ( $r = -0,52$ ,  $p < 0,05$ ) a HMGB - 1 ( $r = 0,578$ ,  $p < 0,001$ ). Hladiny EN - RAGE souvisely s hladinami HMGB - 1 ( $r = 0,477$ ,  $p < 0,05$ ) a CRP ( $r = 0,587$ ,  $p < 0,01$ ).

Ve skupině zdravých dobrovolníků byla pozorována těsná korelace mezi hladinami EN - RAGE a HMGB - 1 o vysoké hladině významnosti ( $r = 0,923$ ,  $p < 0,0001$ ).

## 5.2 Studie 2

Základní biochemická a antropometrická charakteristika nemocných v čase 0 je uvedena v tabulce 5, u těchto dat nebyly pozorovány žádné statisticky významné vztahy.

### 5.2.1 Charakteristika buněčné populace v dialyzátu

Srovnání buněčné populace v dialyzátu z noční výměny mezi oběma skupinami PD pacientů je shrnuto v tabulce 6. V průběhu naší roční studie jsme pozorovali trend ke zvyšování počtu leukocytů a makrofágů v dialyzátu u skupiny E ve srovnání se skupinou P, ale tento rozdíl nedosáhl statistické významnosti u žádného z time pointů. Expres HLA - DR a IL - 6R u makrofágů se v žádném čase odběru mezi skupinami E a P nelišila. I přestože počty mezoteliálních buněk a exprese HLA - DR u mezotelií byly v dialyzátu skupiny E vyšší ve srovnání se skupinou P, rozdíl opět nedosahoval statistické významnosti. Statistické významnosti nedosáhla ani zvýšená mezoteliální exprese IL - 6R v čase 1, kde bylo pozorováno  $p = 0,071$ . Analýza změn počtu leukocytů a mezotelií v průběhu studie (v čase 1, 6 a 12) za použití testu One Way Repeated Measures ANOVA neodhalila žádné změny ve skupině E a P.

### 5.2.2 Markery biokompatibility IL - 6 a CA 125 v dialyzátu

I přes trvajícím trend ke zvýšenému počtu mezoteliálních buněk v dialyzátu skupiny E ve srovnání se skupinou P, byly vyšší hladiny CA 125 pozorovány u skupiny E pouze v čase 6 (tabulka 7). AR CA 125 se mezi jednotlivými PD skupinami nelišila. Dialyzátové hladiny IL - 6 byly v čase 6 vyšší u skupiny E, přičemž AR IL - 6 byla ve skupině E vyšší ve všech sledovaných časech.

Analýza změn dialyzátových hladin IL - 6 a CA 125 v čase v průběhu studie (čas 1, 6, 12) pomocí One Way Repeated Measures ANOVA ukázala pouze nárůst hladiny IL - 6 ve skupině E ve srovnání času 12 a 1,  $p < 0,05$ . I přes pozitivní trend progresivního nárůstu dialyzátové hladiny CA 125 a jeho AR v průběhu studie, nedosahoval rozdíl v čase 12 ve srovnání s časem 1 a 6 statistické významnosti ( $p < 0,078$  a  $p < 0,09$ ). Analýza změn v čase nedokumentovala žádné změny v dialyzátu skupiny P.

### 5.2.3 Analýza souhrnných dat

V dalším kroku jsme, stejně jako Pajek a Lidholm [Pajek J et al. 2008], shrnuli všechna data ze všech tří měření ve skupině E a P. Pozorované signifikantní rozdíly v dialyzátu jsou shrnuty v tabulce 8. U těchto souhrnných dat ze všech tří měření ve skupině E byla pozorována pozitivní signifikantní korelace mezi dialyzátovými hladinami IL – 6 a CA 125 a jejich AR (viz graf 6 a 7) stejně jako u ostatních proměnných v buněčné populaci, jak je shrnuto v tabulce 9. Ve skupině P korelovaly počty granulocytů v dialyzátu, narozdíl od ostatních buněčných typů, s dialyzátovou hladinou CA 125 ( $r = 0,759$ ;  $p < 0,01$ ) a CA 125 AR ( $r = 0,605$ ;  $p < 0,05$ ).

Při srovnávání proměnných v systémové cirkulaci jsme ve skupině E pozorovali vyšší sérové koncentrace CA 125 (20,5 vs 12 kIU/l;  $p < 0,05$ ) a nižší hladiny albuminu (38,3 vs 40,9 g/l;  $p < 0,05$ ). Mezi systémovými a dialyzátovými hladinami IL – 6 a CA 125 a ani mezi jejich AR jsme nepozorovali žádnou korelaci.

### 5.2.4 Systémové markery zánětu, CA 125 a D / P kreatinin

Srovnáním systémových markerů zánětu (počty leukocytů, hladiny albuminu, CRP a IL - 6) mezi skupinami E a P v čase 1, 6 a 12 jsme neprokázali žádné rozdíly. Od začátku studie jsme konstantně pozorovali zvýšené hladiny CA 125 ve skupině E oproti skupině P. Poté při zkoumání vývoje výše zmíněných markerů v čase, za použití testu One Way Repeated Measures ANOVA, jsme znovu v průběhu této roční studie neprokázali žádné signifikantní rozdíly.

Dle vstupního protokolu, popsaného výše, byli pacienti s nižší UF zařazeni do skupiny E, proto jsme u nich očekávaně pozorovali vyšší hodnoty D / P kreatininu ve srovnání se skupinou P v čase 1 a 6 (0,77 vs 0,62;  $p < 0,05$  a 0,78 vs 0,705;  $p < 0,05$ ). V čase 12 se pozorované hodnoty nelišily (0,75 vs 0,75). Analýza dat pak ukázala, že u skupiny E zůstával poměr D / P kreatininu stabilní v průběhu celého roku sledování ve srovnání se vstupními hodnotami, zatímco ve skupině P byl na konci studie pozorován nárůst ve srovnání se vstupními hodnotami ( $p < 0,01$ ). Srovnáním souhrnných dat D / P kreatininu ve skupině E a P jsme pozorovali rozdíl blízký se signifikantní hladině významnosti (0,73 vs 0,61;  $p = 0,071$ ).



## 6 HODNOCENÍ STUDIÍ A DISKUZE

### 6.1 Studie 1

#### 6.1.1 EN – RAGE

Naše nálezy korelace EN - RAGE a CRP u PD pacientů jsou v souladu s pozorováním, že koncentrace EN - RAGE jsou při zánětu zvýšené [Foell D et al. 2003; Kosaki A et al. 2004; Nakashima A et al. 2010]. Navíc PD pacienti s CRP vyšším než medián vykazovali signifikantně vyšší hladiny EN - RAGE. EN - RAGE bylo již u CKD a HD pacientů studováno [Mori Y et al. 2009; Nakashima A et al. 2010; Zakiyanov O, 2011; Shiotsu Y et al. 2011], ale dat o PD pacientech je málo [Uchiyama-Tanaka Y et al. 2008]. Nebyli jsme schopni potvrdit závěry studie u PD pacientů, že vykazují vyšší plazmatické hladiny EN - RAGE než HV. Autoři této studie neuvádějí, jakými peritoneálními dialyzačními roztoky byli jejich pacienti léčeni. Pokud užívali konvenční roztoky s vysokým obsahem GDP, mohlo by to rozdíly vysvětlit, neboť téměř 80 % našich PD pacientů používalo PD roztoky biokompatibilní, tedy s nízkou hladinou GDP. Navíc v naší studii vykazovali PD pacienti nižší plazmatické koncentrace EN - RAGE než CKD. Design naší studie neumožňuje přesné vysvětlení těchto výsledků, takže můžeme pouze spekulovat, zdali zde může hrát roli nižší geneze EN - RAGE při užití biokompatibilních PD roztoků s nízkými koncentracemi GDP v kombinaci s transperitoneální eliminací.

Nenašli jsme ani vztah mezi plazmatickými koncentracemi EN - RAGE a reziduální renální funkcí u PD, ani u CKD pacientů. Stejně tak Zakiyanov, který srovnával plazmatické hladiny EN - RAGE mezi HV, CKD a HD pacienty, nenašel žádný rozdíl [Zakiyanov O, 2011]. Tyto poznatky naznačují, že ledviny nejsou hlavní cestou eliminace EN - RAGE.

### 6.1.2 HMGB – 1

HMGB - 1, které je extracelulárně uvolňováno při vážném buněčném poškození nebo při zánětu, zatím nebylo u PD pacientů intenzivně studováno [Wang H et al. 1999; Scaffidi P, 2002; Yang H et al. 2004]. Námi zjištěná skutečnost, že koncentrace HMGB - 1 v PD effluentu byly vyšší než plazmatické koncentrace a fakt, že nebyla nalezena korelace mezi plazmatickými a effluentovými hladinami HMGB - 1, naznačuje, že HMGB - 1 je generováno intraperitoneálně ve významném množství pravděpodobně díky cytotoxickému působení instilovaného PD roztoku. V poslední době bylo dokázáno, že hladiny HMGB - 1 korelují s reziduální renální funkcí u CKD pacientů a naše data to potvrzují [Bruchfeld A et al. 2008]. Nicméně plazmatické hladiny HMGB - 1 se mezi PD a CKD pacienty nelišily, což naznačuje, že i peritoneální clearance může efektivně snižovat jeho plazmatické hladiny u PD pacientů.

Vzájemná korelace mezi hladinami HMGB - 1 a EN - RAGE demonstrována u všech zkoumaných skupin pacientů (PD, CKD a HV) podporuje myšlenku, že biologická aktivita těchto prozánětlivých ligand spolu úzce souvisí. U PD a CKD pacientů – pacientů se sníženou renální funkcí, což je stav chronického mikrozánětu – korelovaly hladiny HMGB - 1 a EN - RAGE s CRP. Tyto naše výsledky potvrzují data dvou recentních studií [Bruchfeld A et al. 2008; Zhu N et al. 2011]. Ke klinické významnosti těchto zjištění, např. využití HMGB - 1 a / nebo EN - RAGE jako citlivějšího prediktoru dlouhodobých klinických výsledků CKD pacientů než doposud užívaných markerů zánětu, případně jako citlivých ukazatelů biokompatibility peritoneální dialyzačních roztoků, se zatím nelze jednoznačně vyjádřit; k tomu budou zapotřebí další studie. Korelace hladin HMGB - 1 a BMI pozorovaná u CKD pacientů odpovídala již dříve popsané korelaci mezi hladinami HMGB - 1 a nutričními markery, potažmo vzájemnému vztahu mezi zánětem a malnutricí u CKD pacientů obecně [Bruchfeld A et al. 2008].

### 6.1.3 s - RAGE

Nezdá se, že by intraperitoneální zátěž GDP přímo ovlivňovala plazmatické hladiny s - RAGE, protože ty se mezi jednotlivými PD skupinami nelišily. Plazmatické hladiny s - RAGE byly u všech 3 podskupin PD vyšší než dialyzátové a byla u nich pozorována vzájemná pozitivní korelace. Korelace mezi plazmatickými hladinami s - RAGE a  $Kt / V$  indexem popisovaná v naší studii navíc naznačuje, že celková dávka dialýzy (zahrnující transperitoneální eliminaci a reziduální renální funkci) ovlivňuje plazmatické hladiny s - RAGE. V souladu s předešlými studiemi jsme prokázali vyšší plazmatické hladiny s - RAGE u PD a CKD pacientů než u HV [Kalousová M et al. 2006; Basta G et al. 2010]. Ani naše studie však nedokáže rozlišit, jestli je to dáno sníženou renální clearance nebo nadprodukcí s - RAGE ve snaze snížit toxické efekty AGEs akumulovaných u uremických pacientů.

PD pacienti s rychlým peritoneálním transportem jsou popisováni jako pacienti s vyšší kardiovaskulární komorbiditou a s vyšším stupněm zánětu. Uchiyama - Tanaka a spol. skutečně demonstroval vyšší plazmatické hladiny EN - RAGE u PD pacientů s rychlým peritoneálním transportem [Uchiyama-Tanaka Y et al. 2008]. Tyto výsledky jsme nemohli přímo potvrdit, avšak pozorovali jsme, že PD pacienti s rychlým peritoneálním transportem vykazovali vyšší hladiny s - RAGE. K ozřejmění otázky, zda je chování s - RAGE a jeho ligand odlišné v závislosti na rychlosti peritoneálního transportu, bude zapotřebí dalších studií. Zajímavé je, že PD režim s icodextrinem (o kterém je známo, že zvyšuje peritoneální clearance látek o střední molekulové hmotnosti) [Opatrná S, 2003] zvýšil peritoneální clearance jak EN - RAGE (10,6 kDa) [Mirmohammadsadegh A et al. 2000], tak s - RAGE (50 kDa) [Forbes JM et al. 2005] ve srovnání s glukózovým PD režimem. Nicméně design této studie neumožňuje určit podíl vlivu tohoto mechanismu na plazmatické hladiny s - RAGE a EN - RAGE.

#### 6.1.4 GDP

Asi nejdůležitějším poznatkem této studie je, že pacienti léčení režimem s nižší zátěží GDP, tzn. pacienti léčení glukózo - bikarbonát / laktátovým nebo icodextrinovým roztokem (skupina P a E), vykazovali signifikantně nižší plazmatické hladiny prozánětlivých ligand EN - RAGE a HMGB - 1 ve srovnání s pacienty léčenými konvenčním roztokem s vysokou zátěží GDP (skupina D) [Schalkwijk CG, 2000; Erixon M et al. 2006]. Tyto výsledky pak naznačují, že preskripce PD roztoků s nízkým obsahem GDP může být spojena s nižší tvorbou AGEs v systémové cirkulaci a stejně tak s nižší zánětlivou odpovědí. Naproti tomu jsme ale nebyli schopni demonstrovat rozdíly v plazmatických hladinách CRP mezi jednotlivými PD podskupinami. Otázkou zůstává, zdali by za pomoci citlivějšího markeru inflamace, např. IL - 6 [Pachaly MA et al. 2008], byl v naší sledované PD populaci odhalen rozdíl.

Zdá se, že intraperitoneální zátěž GDP je důležitým faktorem zvýšených plazmatických hladin prozánětlivých ligand RAGE. Tento závěr je v soulase s recentně publikovanou multicentrickou klinickou studií ukazující, že výběr PD režimu přímo ovlivňuje systémové hladiny AGEs [le Poole CY et al. 2012]. Expozice PD roztokům s nižším obsahem GDP vede k nižším systémovým hladinám AGEs ve srovnání s konvenčními PD roztoky s vysokým obsahem GDP bez závislosti na koncentraci obsažené glukózy [Zeier M et al. 2003]. GDP během PD výměny mizí z peritoneální dutiny díky své vysoké reaktivitě a ne všechny jsou detekovatelné v plazmě [Erixon M et al. 2009]. Domníváme se, že vyšší plazmatické hladiny prozánětlivých ligand RAGE popisované v naší studii u pacientů léčených konvenčními PD roztoky, odráží akcelerovanou produkci AGEs jako následek vysoké intraperitoneální zátěže GDP.

## 6.2 Studie 2

### 6.2.1 Buněčná populace dialyzátu

V souladu s výsledky předchozích studií využívajících mikroskopické vyšetření buněčné populace dialyzátu po barvení Jenne – Giemsa [Parikova A et al. 2003; Opatrna S et al. 2012], jsme v naší studii, využívající průtokovou cytometrii, dokumentovali trend ke zvyšování počtu leukocytů, makrofágů a mezoteliálních buněk v icodextrinovém dialyzátu. I přes pozorované zvýšené hladiny leukocytů v icodextrinovém dialyzátu, byl tento nález v běžném rozmezí popisovaném v předchozích studiích věnovaných glukózovým roztokům [Lewis S, 1991] a my jsme jej interpretovali jako subklinickou aktivaci inflamace. Vystává tedy otázka, jestli nárůst počtu makrofágů v icodextrinovém dialyzátu naznačuje snížení ztrát makrofágů apoptózou a nekrózou, nebo vypovídá o aktivaci inflamace. Na základě našich dat předpokládáme, že druhá možnost je správná, protože jsme v icodextrinovém dialyzátu pozorovali také vyšší hladiny IL – 6 a AR korelující jak s počtem makrofágů, tak s jejich zánětlivým fenotypem.

Jiná studie v souladu s dřívějším in vitro pozorováním [Witowski J et al. 2004] popisuje zvýšený počet makrofágů, v dialyzátu s nízkou glukózovou zátěží, jako následek snížených ztrát buněk apoptózou a nekrózou a neproказuje korelaci s dialyzátovými hladinami IL – 6 nebo jeho AR, které má navíc v průběhu celé studie tendenci k poklesu [Pajek J et al. 2008]. Námi popisovaný trend ke zvýšení počtu mezoteliálních buněk v icodextrinovém dialyzátu ve srovnání s glukózovým je v souladu s dřívějšími pozorováními [Parikova A et al. 2003; Opatrna S et al. 2012]. Kromě toho je naše studie první, která dokumentuje, na základě HLA – DR exprese na mezoteliálních buňkách zvýšení zánětlivého fenotypu mezoteliálních buněk v E dialyzátu stejně jako korelaci mezi hladinami IL – 6 v dialyzátu a výskytem mezoteliálních buněk IL – 6R, naznačující jejich zánětlivou aktivaci.

## 6.2.2 Markery biokompatibility v dialyzátu

Jak jsme předpokládali, AR IL – 6 bylo u icodextrinových roztoků v průběhu studie zvýšené. Ale je zvýšená aktivace IL – 6 v dialyzátu prospěšná peritoneu jako dialyzační membráně? Je všeobecně přijímáno, že zvýšené hladiny IL – 6 v dialyzátu svědčí o probíhající zánětu, korelují se zvýšeným peritoneálním transportem [Pecoits-Filho R et al. 2006; Oh KH et al. 2010] a jsou tak nežádoucí [Cooker LA et al. 2001; Lopes Barreto D, 2013; Krediet RT, 2013]. Tento názor je také podporován recentní studií, dokumentující na zvířecím modelu, že signalizace IL – 6 řídí fibrózu a ohrožuje reparaci tkání [Fielding CA et al. 2014]. Nicméně, IL - 6 je pleiotropní cytokin vykazující jak pro - tak proti – zánětlivé vlastnosti [Schindler R et al. 1990; Naka T, 2002] a, jak naznačují výsledky in vitro studie, jeho zvýšené hladiny u více biokompatibilních PD roztoků je možné přičíst zvýšenému zachování mezoteliálních buněk [Witowski J et al. 2004]. Někteří výzkumníci interpretují jejich výsledky nárůstu hladin IL - 6 v E dialyzátu jako nález podporující zvýšenou mezoteliální buněčnou masu, ale bez podporující kvantifikace mezoteliálních buněk v dialyzátu [Lui SL et al. 2012].

Nárůst hladiny IL – 6 v icodextrinovém dialyzátu, pozorovaný v naší prospektivní jednoleté studii, se zdá být klinicky nepodstatný. Nepozorovali jsme žádný vliv na systémové markery zánětu a peritoneální transport zůstal nezměněný. Toto pozorování je v souladu s několika [Koomen GC et al. 1994; Opatrna S et al. 2012; Lambie M et al. 2013], ale ne všemi [Pecoits-Filho R et al. 2006; Choi HY et al. 2008] studiemi, které však do pozorování nezařadily pacienty léčené icodextrinovými PD roztoky.

Cheema a Bargmann zpochybnili roli CA 125 jako spolehlivého markeru mezoteliální masy tvrzením, že hladiny CA 125 mohou být ovlivněny zánětem nebo infekcí (když např. při peritonitidě se jeho hladina přechodně zvyšuje až trojnásobně), věkem pacienta a různými jinými faktory [Cheema H, 2013]. Navíc je zajímavé, že recentně byly popisovány zvýšené sérové hladiny CA 125 nejen při malignitách, ale také při srdečním selhání, renální dysfunkci a i při jiných stavem nespojovaných s malignitou [Molina R et al. 1991; Mendez AB et al. 2014; Terada KY et al. 2014].

Analýza souhrnných dat v naší studii dokumentuje zvýšené hladiny a appearance rate CA 125 (spolu se zvýšeným počtem mezoteliálních buněk) v E dialyzátu ve srovnání se skupinou P. Je to nový objev a dosud se věřilo, že ani druh osmotického činidla v PD roztoku a ani obsah glukózy neovlivňuje hladiny CA 125 [Ho-dac-Pannekeet MM et al. 1997; Parikova A et al. 2003; Turhan P et al. 2005]. Rozdíly by mohly být vysvětleny použitím různé metodiky, jako je krátká výměna (4 hodiny), malý počet pozorovaných pacientů

(5 pacientů), nestandardizovaný čas výměny kolísající od 8 do 16 hodin, vyšetřování prevalentních pacientů s různou dobou trvání léčby PD a použitím pediatrické populace pacientů v předchozích studiích [Parikova A et al. 2003; Turhan P et al. 2005; Ho-dac-Pannekeet MM et al. 1997]. Design naší prospektivní studie vycházel ze standardizované výměny trvajcí 10 hodin a byli vyšetřováni pouze incidentní pacienti.

Zatímco v minulých letech byla značná část pozornosti věnována korelaci mezi dialyzátovými hladinami CA 125 a počtem mezoteliálních buněk, v naší studii jsme žádný takovýto vztah nepozorovali. Korelace mezi dialyzátovými hladinami CA 125 a počtem mezoteliálních buněk byla popisována ve dvou studiích Krediet a spol. [Koomen GC et al. 1994; Visser CE et al. 1995]. Relativně nedávno pak jiná další studie popisovala korelaci mezi dialyzátovými hladinami CA 125 a počtem všech a apoptotických mezoteliálních buněk na vak (1,36 % glukózo - laktátový PD roztok, 8 hodinová výměna). Hodnoty objemu a ultrafiltrace z výměny nebyly udány [Kanjanabuch T et al. 2011]. Naproti tomu pak podobná korelace mezi dialyzátovými hladinami CA 125 a počtem mezoteliálních buněk, jak v icodextrinovém, tak v glukózovém PD roztoku, nebyla u dalších studií popisována [le Poole CY et al. 2012; Lui SL et al. 2012]. Vzhledem k tomu, že počet mezoteliálních buněk odloučených z peritonea do dialyzátu tvoří pouhé 1 – 3 % peritoneální buněčné populace, přítomnost nebo nepřítomnost korelace mezi dialyzátovými hladinami CA 125 a počtem mezoteliálních buněk se zdá být, při posuzování spolehlivosti CA 125 jako markeru biokompatibility, zcela nevýznamným faktem [Koomen GC et al. 1994; Lai KN et al. 1997]. V tomto ohledu by byly určující histologické a / nebo funkční nálezy, které je však obtížné v lidských studiích získat.

V prezentované studii jsme pozorovali signifikantní korelaci mezi hladinami CA 125 a IL – 6 stejně jako mezi jejich appearance rate u icodextrinových PD roztoků. Taková korelace zatím v předchozích studiích pozorovaná nebyla. Autoři používali glukózové PD roztoky s vyšší nebo nižší mírou biokompatibility, u kterých se zdá, že indukují nižší intraperitoneální produkci IL – 6 a CA 125 [Rodrigues AS et al. 2007; Lopes Barreto D et al. 2011]. Podobně jsme my v naší studii nepozorovali žádnou korelaci mezi hladinami CA 125 a IL – 6 ve skupině P (glukózo – bikarbonát / laktátový PD roztok).

Zatímco u CA 125, kde ve skupině E korelovaly jeho dialyzátové hladiny s většinou ostatních markerů zánětu, podobná korelace byla u skupiny P pozorována pouze u počtu granulocytů. Tyto nálezy podporují domněnku, že icodextrinový PD roztok aktivuje intraperitoneální inflamaci zvyšující produkci CA 125 u mezoteliálních buněk, které jsou v peritoneální dutině jako jediné schopné CA 125 produkovat. Vzhledem k jeho molekulové hmotnosti je pak

transport CA 125 ze systémového oběhu minimální, takže je nepravděpodobné, že by mohl významně ovlivnit jeho dialyzátové hladiny.

Design naší studie nám nedovoluje identifikovat konkrétní látku obsaženou v icodextrinovém PD roztoku zodpovědnou za aktivaci inflamace a zvýšenou produkci CA 125. A stejně tak při absenci vlivu na peritoneální transport a systémovou inflamaci není jasné, do jaké míry jsou tyto laboratorní nálezy klinicky významné. K zodpovězení těchto otázek je zapotřebí dalších studií zahrnujících morfologické hodnocení. Jsme si vědomi malého počtu zařazených pacientů a považujeme to za hlavní limitaci naší studie.



## 7 ZÁVĚR

Při porovnávání biokompatibility aktuálně nejčastěji používaných PD roztoků jsme podpořili všeobecně přijímanou domněnku, že PD roztoky s nízkou zátěží GDP jsou více biokompatibilní, protože vyvolávají nižší systémovou i lokální zánětlivou odpověď, což jsme demonstrovali pozorovanými nižšími systémovými hladinami prozánětlivých ligand RAGE (EN – RAGE a HMGB -1). Navíc jsme dokázali, že expozice PD roztokům s nižším obsahem GDP vede k nižším systémovým hladinám AGEs ve srovnání s konvenčními PD roztoky s vysokým obsahem GDP, bez závislosti na koncentraci obsažené glukózy.

HMGB – 1 dosud nebylo u PD pacientů intenzivně studováno, ale vzhledem k absenci jakéhokoliv vztahu mezi jeho plazmatickými a dialyzátovými hladinami a vzhledem k jeho signifikantně vyšším dialyzátovým hladinám můžeme říci, že je generováno intraperitoneálně nejspíše díky lokálnímu cytotoxickému působení PD roztoku. Navíc jsme popsali souvislost mezi hladinami EN – RAGE a HMGB – 1 a hladinami CRP jako systémového markeru zánětu, čehož by bylo možno do budoucna využít při stanovování těchto ligand jako citlivých ukazatelů biokompatibility PD roztoků.

V další studii jsme demonstrovali, že icodextrinové PD roztoky aktivují lokální zánětlivou odpověď bez zřejmých systémových souvislostí, jako je elevace systémových markerů zánětu a změna peritoneální permeability. Korelace mezi dialyzátovými hladinami IL – 6 a CA 125 naznačuje, že produkce CA 125 může být stimulována zánětem a proto se CA 125 nezdá být spolehlivým markerem mezoteliální masy a / nebo biokompatibility, ač je takto zatím užíván.

Do budoucna zbývá objasnit klinické důsledky našich pozorování s ohledem na morbiditu a mortalitu PD pacientů.

## **8 PODĚKOVÁNÍ A PODPORA**

Ráda bych poděkovala mé školitelce prof. MUDr. Sylvii Opatrné, Ph.D. za odborné a trpělivé vedení v průběhu celého studia a za všestrannou podporu i v dalších aspektech lékařské práce.

Chtěla bych poděkovat i prof. MUDr. Martinu Matějovičovi, Ph.D., přednostovi I. interní kliniky FN a LF UK v Plzni, který mi mé studium a práci lékaře umožnil.

Navíc bych chtěla poděkovat i paní Haně Šlajsové, sestře z ambulance peritoneální dialýzy, díky jejímž znalostem, organizačním schopnostem a lidskému přístupu bylo získávání důležitých informací o pacientech mnohem snazší.

A nakonec díky patří i paní Lídě Reifové za technickou podporu.

Studie vznikly za podpory Hlavního výzkumného záměru MSM 002160819 a PRVOUKu P25/LF1/2, dále za podpory Evropského fondu pro regionální rozvoj ED2.1.00/03.0076 a grantu České nefrologické společnosti 2013/02.

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Basta G, Leonardis D, Mallamaci F et al. Circulating soluble receptor of advanced glycation end product inversely correlates with atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2010; 77(3):225- 31.

Bazzato G, Coli U, Landini S et al. Xylitol as osmotic agent in CAPD: an alternative to glucose for uremic diabetic patients? *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* 1982; 28:280-6.

Bonomini M, Di Liberato L, Del Rosso G et al. Effect of an L-carnitine-containing peritoneal dialysate on insulin sensitivity in patients treated with CAPD: a 4-month, prospective, multicenter randomized trial. *Am J Kidney Dis.* 2013 Nov; 62(5):929-38.

Breborowicz A, Breborowicz M, Pyda M et al.: Limitations of CA125 as an index of peritoneal mesothelial cell mass. *Nephron Clin Pract.* 2005; 100(2):c46-51.

Bruchfeld A, Qureshi AR, Lindholm B et al. High Mobility Group Box Protein-1 correlates with renal function in chronic kidney disease (CKD). *Mol Med.* 2008; 14(3-4):109-15.

Buys SS, Partridge E, Black A et al.: Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA.* 2011 Jun 8; 305(22):2295-303.

Camci C, Büyükberber S, Tarakçioğlu M et al.: The effect of continuous ambulatory peritoneal dialysis on serum CA-125 levels. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2002; 23(5):472-4.

Candan C, Turhan P, Sever L et al.: Dialysate CA125 levels after 5 years on continuous peritoneal dialysis. *Pediatr Nephrol.* 2011 May; 26(5):783-8.

Cooker LA, Luneburg P, Holmes CJ et al. Interleukin-6 levels decrease in effluent from patients dialyzed with bicarbonate/lactate-based peritoneal dialysis solutions. *Perit Dial Int.* 2001; 21 Suppl 3:S102-7.

De Vecchi AF, Arduini A, Di Liberato L et al. L-carnitine in peritoneal dialysis. *G Ital Nefrol.* 2011 Jul-Aug; 28(4):393-400.

Erixon M, Wieslander A, Lindén T et al. 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in peritoneal dialysis fluids infused into the peritoneal cavity cannot be found in plasma. *Perit Dial Int.* 2009; 29 Suppl 2:S28-31.

Erixon M, Wieslander A, Lindén T et al. How to avoid glucose degradation products in peritoneal dialysis fluids. *Perit Dial Int.* 2006; 26(4):490-7.

Fang W, Mullan R, Shah H et al.: Comparison between bicarbonate/lactate and standard lactate dialysis solution in peritoneal transport and ultrafiltration: a prospective, crossover single-dwell study. *Perit Dial Int.* 2008 Jan-Feb; 28(1):35-43.

Fernández-Perpén A, Pérez-Lozano ML, Bajo MA et al. Influence of bicarbonate/low-GDP peritoneal dialysis fluid (BicaVera) on in vitro and ex vivo epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *Perit Dial Int.* 2012 May-Jun; 32(3):292-304.

Fielding CA, Jones GW, McLoughlin RM et al. Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation. *Immunity.* 2014 Jan 16; 40(1):40-50.

Foell D, Ichida F, Vogl T et al. S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease. *Lancet.* 2003; 361(9365):1270-2.

Forbes JM, Thorpe SR, Thallas-Bonke V et al. Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibition in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(8):2363-72.

Fusshöller A, Grabensee B, Plum J. Effluent CA 125 concentration in chronic peritoneal dialysis patients: influence of PD duration, peritoneal transport and PD regimen. *Kidney Blood Press Res.* 2003; 26(2):118-22.

Gokal R. Peritoneal dialysis in the 21st century: an analysis of current problems and future developments. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Jan; 13 Suppl 1:S104-16.

Haas S, Schmitt CP, Arbeiter K et al.: Improved acidosis correction and recovery of mesothelial cell mass with neutral-pH bicarbonate dialysis solution among children undergoing automated peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Oct; 14(10):2632-8.

Hain H, Schütte W, Pustelnik A et al. Ultrafiltration and absorption characteristics of

hydroxyethylstarch and dextran during long dwell peritoneal dialysis exchanges in rats. *Adv Perit Dial.* 1989;5:28-30.

Henning C, Smuda M, Girndt M, Ulrich C, Glomb MA. Molecular basis of Maillard amide-advanced glycation end product (AGE) formation in vivo. *J Biol Chem.* 2011; 286(52):44350-6.

Ho-dac-Pannekeet MM, Hiralall JK, Struijk DG et al. Longitudinal follow-up of CA125 in peritoneal effluent. *Kidney Int.* 1997 Mar; 51(3):888-93.

Cheema H, Bargman JM. Cancer antigen 125 as a biomarker in peritoneal dialysis: mesothelial cell health or death? *Perit Dial Int.* 2013 Jul-Aug; 33(4):349-52.

Choi HY, Kim DK, Lee TH et al. The clinical usefulness of peritoneal dialysis fluids with neutral pH and low glucose degradation product concentration: an open randomized prospective trial. *Perit Dial Int.* 2008 Mar-Apr; 28(2):174-82.

Jain AK, Blake P, Cordy P et al. Global Trends in Rates of Peritoneal Dialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2012 March; 23(3): 533–544.

Jones S, Holmes CJ, Krediet RT et al.: Bicarbonate/lactate-based peritoneal dialysis solution increases cancer antigen 125 and decreases hyaluronic acid levels. *Kidney Int.* 2001 Apr; 59(4):1529-38.

Kalousová M, Hodková M, Kazderová M et al. Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *Am J Kidney Dis.* 2006; 47(3):406-11.

Kanjanabuch T, Puttipittayathorn N, Leelahavanichkul A et al. Exfoliated mesothelial cell and CA-125 in automated peritoneal dialysis (APD) and continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) patients. *J Med Assoc Thai.* 2011 Sep; 94 Suppl 4:S119-25.

Kilis-Pstrusinska K, Szajerka U, Zwolinska D. Unspecific increase of tumor markers in a girl with nephrotic syndrome and ovarian teratoma. *Ren Fail.* 2013; 5(5):654-6.

Kim JK, Park S, Lee MJ et al. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and proinflammatory ligand for RAGE (EN-RAGE) are associated with carotid atherosclerosis in patients with peritoneal dialysis. *Atherosclerosis.* 2012; 220(1):208-14.

Kim S, Oh J, Kim S et al.: Benefits of biocompatible PD fluid for preservation of residual renal function in incident CAPD patients: a 1-year study. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Sep; 24(9):2899-908.

Koomen GC, Betjes MG, Zemel D et al.: Cancer antigen 125 is locally produced in the peritoneal cavity during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*. 1994; 14(2):132-6.

Kosaki A, Hasegawa T, Kimura T et al. Increased plasma S100A12 (EN-RAGE) levels in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(11):5423-8.

Krediet RT, Struijk DG. Peritoneal changes in patients on long-term peritoneal dialysis. *Nat Rev Nephrol*. 2013 Jul; 9(7):419-29.

Krediet RT. Dialysate cancer antigen 125 concentration as marker of peritoneal membrane status in patients treated with chronic peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*. 2001 Nov-Dec; 21(6):560-7.

Lai KN, Lai KB, Szeto CC et al. Dialysate cell population and cancer antigen 125 in stable continuous ambulatory peritoneal dialysis patients: their relationship with transport parameters. *Am J Kidney Dis*. 1997 May; 29(5):699-705.

Lai KN, Lam MF, Leung JC et al. A study of the clinical and biochemical profile of peritoneal dialysis fluid low in glucose degradation products. *Perit Dial Int*. 2012 May-Jun; 32(3):280-91.

Lai KN, Leung JC. Inflammation in peritoneal dialysis. *Nephron Clin Pract*. 2010; 116(1):c11-8.

Lambie M, Chess J, Donovan KL et al. Independent effects of systemic and peritoneal inflammation on peritoneal dialysis survival. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Dec; 24(12):2071-80.

le Poole CY, van Ittersum FJ, Valentijn RM et al. "NEPP" peritoneal dialysis regimen has beneficial effects on plasma CEL and 3-DG, but not pentosidine, CML, and MGO. *Perit Dial Int*. 2012 Jan-Feb; 32(1):45-54.

le Poole CY, Welten AG, ter Wee PM et al. A peritoneal dialysis regimen low in glucose and glucose degradation products results in increased cancer antigen 125 and peritoneal activation.

Perit Dial Int. 2012 May-Jun; 32(3):305-15.

Lee E, Seo EY, Kwon Y et al. Rapid and reliable measurement for evaluating directly the reactivity of N-acetylcysteine with glucose degradation products in peritoneal dialysis fluids. Anal Chem. 2011 Mar 1; 83(5):1518-22.

Lewis S, Holmes C. Host defense mechanisms in the peritoneal cavity of continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. 1. Perit Dial Int. 1991; 11(1):14-21.

Lopes Barreto D, Coester AM, Noordzij M et al. Variability of effluent cancer antigen 125 and interleukin-6 determination in peritoneal dialysis patients. Nephrol Dial Transplant. 2011 Nov; 26(11):3739-44.

Lopes Barreto D, Krediet RT. Current status and practical use of effluent biomarkers in peritoneal dialysis patients. Am J Kidney Dis. 2013 Oct; 62(4):823-33.

Lui SL, Yung S, Yim A et al. A combination of biocompatible peritoneal dialysis solutions and residual renal function, peritoneal transport, and inflammation markers: a randomized clinical trial. Am J Kidney Dis. 2012 Dec; 60(6):966-75.

Martikainen TA, Teppo AM, Grönhagen-Riska C et al.: Glucose-free dialysis solutions: inductors of inflammation or preservers of peritoneal membrane? Perit Dial Int. 2005 Sep-Oct; 25(5):453-60.

Méndez AB, Ordoñez-Llanos J, Ferrero A et al.: Prognostic value of increased carbohydrate antigen in patients with heart failure. World J Cardiol. 2014 Apr 26; 6(4):205-12.

Menzin AW, Kobrin S, Pollak E et al.: The effect of renal function on serum levels of CA 125. Gynecol Oncol. 1995 Sep; 58(3):375-7.

Mirmohammadsadegh A, Tschakarjan E, Ljoljic A et al. Calgranulin C is overexpressed in lesional psoriasis. J Invest Dermatol. 2000;114(6):1207-8.

Mittelmaier S, Fünfroeken M, Fenn D et al. 3-Deoxygalactosone, a new glucose degradation product in peritoneal dialysis fluids: identification, quantification by HPLC/DAD/MSMS and its pathway of formation. Anal Bioanal Chem. 2011 Feb; 399(4):1689-97.

Mittelmaier S, Niwa T, Pischetsrieder M. Chemical and physiological relevance of glucose degradation products in peritoneal dialysis. *J Ren Nutr.* 2012 Jan; 22(1):181-5.

Molina R, Filella X, Bruix J et al.: Cancer antigen 125 in serum and ascitic fluid of patients with liver diseases. *Clin Chem.* 1991 Aug; 37(8):1379-83.

Montenegro J, Saracho RM, Martínez IM et al.: Long-term clinical experience with pure bicarbonate peritoneal dialysis solutions. *Perit Dial Int.* 2006 Jan-Feb; 26(1):89-94.

Mori Y, Kosaki A, Kishimoto N et al. Increased plasma S100A12 (EN-RAGE) levels in hemodialysis patients with atherosclerosis. *Am J Nephrol.* 2009; 29(1):18-24.

Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res.* 2002; 4 Suppl 3:S233-42.

Nakashima A, Carrero JJ, Qureshi AR et al. Effect of circulating soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and the proinflammatory RAGE ligand (EN-RAGE, S100A12) on mortality in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010 Dec; 5(12):2213-9.

Nascimento MM, Suliman ME, Silva M et al. Effect of oral N-acetylcysteine treatment on plasma inflammatory and oxidative stress markers in peritoneal dialysis patients: a placebocontrolled study. *Perit Dial Int.* 2010 May-Jun;30(3):336-42.

Nasrallah MM, El-Shehaby AR, Osman NA et al. Endogenous soluble receptor of advanced glycation end-products (esRAGE) is negatively associated with vascular calcification in non-diabetic hemodialysis patients. *Int Urol Nephrol.* 2012; 44(4):1193-9.

Nishimura H, Ikehara O, Naito T et al. Evaluation of taurine as an osmotic agent for peritoneal dialysis solution. *Perit Dial Int.* 2009 Mar-Apr; 29(2):204-16.

Nishizawa Y, Koyama H, Inaba M. AGEs and cardiovascular diseases in patients with end-stage renal diseases. *J Ren Nutr.* 2012 Jan; 22(1):128-33.

Oh KH, Jung JY, Yoon MO et al. Intra-peritoneal interleukin-6 system is a potent determinant of the baseline peritoneal solute transport in incident peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2010 May;25(5):1639-46.



Oleniuc M, Schiller A, Secara I et al. Evaluation of advanced glycation end products accumulation, using skin autofluorescence, in CKD and dialysis patients. *Int Urol Nephrol.* 2012; 44(5):1441-9.

Opatrna S, Lysak D, Trefil L et al. Intraperitoneal IL-6 signaling in incident patients treated with icodextrin and glucose bicarbonate/lactate-based peritoneal dialysis solutions. *Perit Dial Int.* 2012 Jan-Feb; 32(1):37-44.

OPATRná Sylvie. *Peritoneální dialyzační roztoky druhé generace: preklinické studie a klinické zkušenosti.* 1. vydání, 2009. Plzeň: Euroverlag. ISBN 978 – 80 – 7177 – 017 – 6.

Opatrná S, Opatrný K Jr, Racek J, Sefrna F. Effect of icodextrin-based dialysis solution on peritoneal leptin clearance. *Perit Dial Int.* 2003; 23(1):89-91.

Pachaly MA, do Nascimento MM, Suliman ME et al. Interleukin-6 is a better predictor of mortality as compared to C-reactive protein, homocysteine, pentosidine and advanced oxidation protein products in hemodialysis patients. *Blood Purif.* 2008; 26(2):204-10.

Pajek J, Kveder R, Bren A et al. Short-term effects of a new bicarbonate/lactate-buffered and conventional peritoneal dialysis fluid on peritoneal and systemic inflammation in CAPD patients: a randomized controlled study. *Perit Dial Int.* 2008 Jan-Feb; 28(1):44-52.

Pannekeet MM, Zemel D, Koomen GC et al.: Dialysate markers of peritoneal tissue during peritonitis and in stable CAPD. *Perit Dial Int.* 1995 Jul-Sep; 15(6):217-25.

Parikova A, Struijk DG, Zweers MM et al. Does the biocompatibility of the peritoneal dialysis solution matter in assessment of peritoneal function? *Perit Dial Int.* 2007 Nov-Dec; 27(6):691-6.

Parikova A, Zweers MM, Struijk DG et al. Peritoneal effluent markers of inflammation in patients treated with icodextrin-based and glucose-based dialysis solutions. *Adv Perit Dial.* 2003; 19:186-90.

Pasqual E, Bacchetti S, Morabito G et al.: The length of peritoneal surgical manipulation correlates with serum CA 125 levels. *In Vivo.* 2011 Jan-Feb; 25(1):105-9.

Pecoits-Filho R, Carvalho MJ, Stenvinkel P et al. Systemic and intraperitoneal interleukin-6 system during the first year of peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 2006 Jan-Feb; 26(1):53-63.

Perl J, Nessim SJ, Bargman JM. The biocompatibility of neutral pH, low-GDP peritoneal dialysis solutions: benefit at bench, bedside, or both? *Kidney Int.* 2011 Apr; 79(8):814-24.

Qayyum A, Oei EL, Paudel K et al. Increasing the use of biocompatible, glucose-free peritoneal dialysis solutions. *World J Nephrol.* 2015 Feb 6; 4(1):92-7.

Rodrigues AS, Martins M, Korevaar JC et al. Evaluation of peritoneal transport and membrane status in peritoneal dialysis: focus on incident fast transporters. *Am J Nephrol.* 2007; 27(1):84-91.

Rychlík I., Lopot F. *Statistická ročenka dialyzační léčby v České republice v roce 2013*

Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002; 418(6894):191-5.

Shiotsu Y, Mori Y, Nishimura M et al. Plasma S100A12 level is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011; 6(4):718-23.

Shu ZJ, Peng YM, Sun L et al. Maltose, a promising osmotic agent in peritoneal dialysis solution. *Med Hypotheses.* 2010 Dec; 75(6):645-7.

Schalkwijk CG, ter Wee PM, Teerlink T. Reduced 1,2-dicarbonyl compounds in bicarbonate/lactate-buffered peritoneal dialysis (PD) fluids and PD fluids based on glucose polymers or amino acids. *Perit Dial Int.* 2000; 20(6):796-8.

Schindler R, Mancilla J, Endres S et al. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood.* 1990 Jan 1; 75(1):40-7.

Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Ann Rev Immunol.* 2010; 28:367-88.

Szeto CC, Chow KM, Lam CW et al.: Clinical biocompatibility of a neutral peritoneal dialysis solution with minimal glucose-degradation products-a 1-year randomized control trial. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Feb; 22(2):552-9.

Teitelbaum I, Burkart J. Peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis.* 2003 Nov; 42(5):1082-96.

Terada KY, Elia J, Kim R et al.: Abnormal CA-125 levels in menopausal women without ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2014 Oct; 135(1):34-7.

Theodoridis M, Passadakis P, Kriki P et al.: The alteration of dialysate cancer antigen 125 concentration under a biocompatible bicarbonate peritoneal dialysis solution and the preservation of the mesothelial cell viability. *Ren Fail.* 2008; 30(2):161-7.

Turhan P, Sever L, Caliskan S et al. Dialysate CA125 levels in children on continuous peritoneal dialysis. *Pediatr Nephrol.* 2005 Nov; 20(11):1615-21.

Turk HM, Pekdemir H, Buyukberber S et al.: Serum CA 125 levels in patients with chronic heart failure and accompanying pleural fluid. *Tumour Biol.* 2003 Aug-Sep; 24(4):172-5.

Uchiyama-Tanaka Y, Mori Y, Kosaki A et al. Plasma S100A12 concentrations in peritoneal dialysis patients and subclinical chronic inflammatory disease. *Ther Apher Dial.* 2008; 12(1):28-32.

Visser CE, Brouwer-Steenbergen JJ, Betjes MG et al.: Cancer antigen 125: a bulk marker for the mesothelial mass in stable peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1995; 10(1):64-9.

Wang H, Bloom O, Zhang M et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science.* 1999; 285(5425):248-51.

Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med.* 2004; 255(3):320-31.

Weiss L, Stegmayr B, Malmsten G et al. Biocompatibility and tolerability of a purely bicarbonate-buffered peritoneal dialysis solution. *Perit Dial Int.* 2009 Nov-Dec; 29(6):647-55.

Williams JD, Topley N, Craig KJ et al.: The Euro-Balance Trial: the effect of a new biocompatible peritoneal dialysis fluid (balance) on the peritoneal membrane. *Kidney Int.* 2004 Jul; 66(1):408-18.

Witowski J, Jörres A. Glucose degradation products: relationship with cell damage. *Perit Dial Int.*

2000; 20 Suppl 2:S31-6.

Witowski J, Korybalska K, Ksiazek K et al. Peritoneal dialysis with solutions low in glucose degradation products is associated with improved biocompatibility profile towards peritoneal mesothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:917-924.

Witowski J, Wisniewska J, Korybalska K et al. Prolonged exposure to glucose degradation products impairs viability and function of human peritoneal mesothelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Nov; 12(11):2434-41.

Yang H, Ochani M, Li J et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(1):296-301. Epub 2003 Dec 26.

Yilmaz H, Gürel OM, Celik HT et al.: CA 125 levels and left ventricular function in patients with end-stage renal disease on maintenance hemodialysis. *Ren Fail*. 2014 Mar; 36(2):210-6.

Zakiyanov O, Kalousová M, Kříha V et al. Serum S100A12 (EN-RAGE) levels in patients with decreased renal function and subclinical chronic inflammatory disease. *Kidney Blood Press Res*. 2011; 34(6):457-64.

Zeier M, Schwenger V, Deppisch R et al. Glucose degradation products in PD fluids: do they disappear from the peritoneal cavity and enter the systemic circulation? *Kidney Int*. 2003; 63(1):298-305.

Zeillemaker AM, Verbrugh HA, Hoyneck van Papendrecht AA et al.: CA 125 secretion by peritoneal mesothelial cells. *J Clin Pathol*. 1994 Mar; 47(3):263-5.

Zeimet AG, Offner FA, Marth C et al.: Modulation of CA-125 release by inflammatory cytokines in human peritoneal mesothelial and ovarian cancer cells. *Anticancer Res*. 1997 Jul-Aug; 17(4B):3129-31.

Zhu N, Yuan W, Zhou Y et al. High mobility group box protein-1 correlates with microinflammatory state and nutritional status in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *J Artif Organs*. 2011; 14(2):125-32.

## 10 TABULKY A GRAFY

Tabulka 1 - Přehled identifikovaných GDP v glukózových PD roztocích

Tabulka 2 - Srovnání CRP a albuminu mezi skupinami HV, CKD a PD

Tabulka 3 - Základní klinická charakteristika

Tabulka 4 - Srovnání plazmatických hladin s - RAGE, CRP a albuminu mezi jednotlivými PD skupinami

Tabulka 5 - Základní laboratorní a antropometrická data (plazmatické a sérové hladiny)

Tabulka 6 - Charakteristika buněčné populace v dialyzátu

Tabulka 7 - Základní biochemická a klinická data (plazmatické a sérové hladiny)

Tabulka 8 - Souhrnná data E vs. P

Tabulka 9 - Korelační analýza souhrnných dat skupiny E

Graf 1 - Srovnání plazmatických hladin s - RAGE mezi skupinami HV, CKD a PD pacientů

Graf 2 - Srovnání plazmatických hladin HMGB - 1 mezi skupinami HV, CKD a PD pacientů

Graf 3 - Srovnání plazmatických hladin EN-RAGE mezi skupinami HV, CKD a PD pacientů

Graf 4 - Srovnání plazmatických hladin EN - RAGE mezi skupinami E, P, D

Graf 5 - Srovnání plazmatických hladin HMGB - 1 mezi skupinami E, P, D

Graf 6 - Dialyzátové hladiny IL - 6 and CA 125 u Extranealu

Graf 7 - Appearance rate IL – 6 a CA 125 u Extranealu

Tabulka 1- Přehled identifikovaných GDP v glukózových PD roztocích

Degradační produkt glukózy	Detekován v dialyzátu
5 - hydroxymethylfuraldehyd	+
acetaldehyd	+
formaldehyd	+
2 - furaldehyd	+
glyoxal	+
methylglyoxal	+
valeraldehyd	+
kyselina mravenčí	-
kyselina levulinová	-
kyselina 5 - hydroxymetylfuroová	-
kyselina 2,5 - dikarboxylová	-
2 - keto - 3 - deoxyglukóza	-
2 - (2' - hydroxyacetyl) - furan	-
3 - deoxyglukozon	+
3,4 - dideoxyglukozon	+

Tabulka 2 - Srovnání CRP a albuminu mezi skupinami HV, CKD a PD

	HV			CKD			PD		
	median	min	max	median	min	max	median	min	max
<b>CRP (mg/l)</b>	1,0	1,0	19,0	4,5	1,0	20,0	2,0	1,0	19,0
<b>albumin (g/l)</b>	50,8 <sup>a</sup>	44,3	55,2	43,0 <sup>b</sup>	36,1	51,9	40,7	34,1	46,7

p – hladina významnosti

a – p < 0,05 PD vs HV

b – p < 0,05 PD vs CKD

Tabulka 3 - Základní klinická charakteristika

	D			E			P		
	median	min	max	median	min	max	median	min	max
<b>D/P kreatinin</b>	0,6	0,5	0,7	0,8 <sup>c,d</sup>	0,6	0,9	0,7	0,4	0,8
<b>Kt / V</b>	2,1	1,4	2,7	2,1	1,2	2,4	2	1,6	2,3
<b>RRF(ml/min)</b>	6,7	2,1	15,4	5,6	0	11,5	7,6	0	10,7
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	28,6	25,6	43,0	25,5 <sup>b</sup>	20,2	34,9	25,3 <sup>a</sup>	17,5	35,5
<b>věk (roky)</b>	61	44	71	63 <sup>d</sup>	38	84	50 <sup>a</sup>	20	72

p – hladina významnosti

a - p < 0,02 D vs P

b - p < 0,05 D vs E

c - p < 0,01 D vs E

d - p < 0,01 P vs E

Tabulka 4 - Srovnání plazmatických hladin s - RAGE, CRP a albuminu mezi jednotlivými PD skupinami

	D			E			P		
	median	min	max	median	min	max	median	min	max
<b>s - RAGE (ng/ml)</b>	1,8	1,5	6,4	2,8	1,2	5	1,9	1,1	6,2
<b>CRP (mg/l)</b>	4.0	1.0	19.0	4.5	1.0	26.0	1.0	1.0	7.0
<b>albumin (g/l)</b>	41.2	36.9	46.6	38.4	29.8	47.3	41.1	34.1	45.0

Tabulka 5 - Základní laboratorní a antropometrická data (plazmatické a sérové hladiny)

	<b>Extraneal</b>	<b>Physioneal</b>
	median (min - max)	median (min - max)
<b>Hb</b> (g/l)	102 (83 - 121)	102,5 (94 - 122)
<b>leukocyty</b> ( $10^9/l$ )	7 (5 - 10,6)	7,4 (3,7 - 10,7)
<b>urea</b> (mmol/l)	25,7 (13,7 - 41,2)	25,8 (14,9 - 45,9)
<b>kreatinin</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	606 (243 - 794)	581 (408 - 803)
<b>albumin</b> (g/l)	40,7 (36,2 - 47,8)	41,1 (39,1 - 44,7)
<b>CRP</b> (mg/l)	8 (1 - 23)	5 (3 - 16)
<b>IL - 6</b> (ng/l)	6,0 (3,9 - 14,9)	6,1 (4 - 9,5)
<b>CA 125</b> (IU/ml)	23 (8 - 84)	16,5 (6 - 25)
<b>GFR</b> (ml/s)	0,1 (0,1 - 0,3)	0,1 (0,1 - 0,2)



Tabulka 6 - Charakteristika buněčné populace v dialyzátu

		<b>Extraneal</b>	<b>Physioneal</b>	<b>p</b>
		median (min - max)	median (min - max)	hladina významnosti
<b>Leukocyty</b> ( $10^6/l$ )	1	9,8 (1,1 – 42,2)	7,7 (2,9 – 21,2)	NS
	6	20,6 (6,4 – 65,2)	5,4 (2,9 - 8)	NS
	12	19,3 (4,8 – 33,1)	8,6 (2,1 - 27)	NS
<b>Lymfocyty</b> ( $10^6/l$ )	1	0,9 (0 – 4)	1,8 (0,6 – 4,3)	NS
	6	1,3 (0,6 – 10,8)	1,4 (0,7 – 1,7)	NS
	12	1,2 (0,8 – 9,9)	2 (0,3 – 3,7)	NS
<b>Granulocyty</b> ( $10^6/l$ )	1	0,1 (0 – 0,5)	0,1 (0 – 0,5)	NS
	6	0,1 (0,1 – 10,6)	0,3 (0 – 1,2)	NS
	12	0,1 (0 – 0,8)	0,2 (0,1 – 0,2)	NS
<b>Makrofágy</b> ( $10^6/l$ )	1	3,1 (0 – 15,8)	2,1 (0,7 – 9,1)	NS
	6	15,4 (3,2 – 46,9)	2,8 (1,1 - 5)	NS
	12	12,4 (2,8 – 22,4)	4 (1,2 – 17,6)	NS
<b>Mezoteliální buňky</b> ( $10^6/l$ )	1	0,5 (0,1 – 2,1)	0,2 (0 – 0,5)	NS
	6	0,5 (0,1 – 1,4)	0,1 (0 – 0,2)	NS
	12	0,2 (0 – 0,3)	0,1 (0,1 – 0,2)	NS
<b>Makrofágy DR MESF</b>	1	82481 (57825 - 220693)	98926 (64754 - 204212)	NS
	6	87041 (29833 - 309067)	160317,5 (588 - 169388)	NS
	12	83262,5 (33747 - 232662)	3283 (364 - 222710)	NS
<b>Makrofágy IL-6R MESF</b>	1	7174 (3252 - 7382)	3582 (2243 - 7102)	NS
	6	5036 (2764 - 12347)	4937 (2771 - 6015)	NS
	12	4628,5 (1914 - 7312)	4342 (3068 - 5606)	NS
<b>Mezoteliální buňky DR MESF</b>	1	1907 (1349 - 2364)	1415 (1000 - 8046)	NS
	6	2562 (1813 - 3102)	1329 (957 - 2707)	NS
	12	1914,5 (875 - 3449)	828 (506 - 1199)	NS
<b>Mezoteliální buňky IL-6R MESF</b>	1	3135 (2813 - 3199)	2043 (1356 - 3026)	NS
	6	2568 (1571 - 3426)	2223,5 (1954 - 3904)	NS
	12	1822,5 (1386 - 3100)	2324 (2319 - 3022)	NS

NS – nesignifikantní (not significant)

MESF – fluorescenční intenzita měřená jednotkami MESF

DR and IL-6R – exprese markerů aktivovaných zánětem

Tabulka 7 - Základní biochemická a klinická data (plazmatické a sérové hladiny)

Měsíc studie	Extraneal			Physioneal		
	1	6	12	1	6	12
	median (min - max)	median (min - max)	median (min - max)	median (min - max)	median (min - max)	median (min - max)
<b>CRP</b> (mg/l)	3 (1 - 20)	2,5 (1 - 26)	4,5 (1 - 26)	3 (1 - 15)	3 (1 - 31)	6,5 (1 - 26)
<b>IL-6</b> (ng/l)	9,4 (4,9 - 14,4)	12,1 (3,3 - 19,3)	10,9 (7,6 - 5,2)	6,7 (5,6 - 10,4)	6,9 (6,6 - 20,3)	10 (8,1 - 12,4)
<b>CA 125</b> (IU/ml)	20,5 (16 - 122)	29 (16 - 69)	37,5 (21 - 159)	13,5 (6 - 24) <sup>a</sup>	11,5 (10 - 14) <sup>c</sup>	10 (8 - 12) <sup>e</sup>
<b>leukocyty</b> (10 <sup>9</sup> /l)	6,9 (4,9 - 13,2)	6,6 (4,8 - 13)	7,1 (3,6 - 10,6)	6,4 (4,2 - 8,9)	6,6 (4,1 - 9)	6,1 (4,2 - 9,1)
<b>albumin</b> (g/l)	38 (33,9 - 42,7)	38,8 (32,3 - 40,9)	37,8 (27,5 - 42,7)	40,9 (35,8 - 45,4)	41,1 (38,6 - 45)	35,9 (30,5 - 41,3)
<b>D/P kreatinin</b>	0,8 (0,5 - 0,9)	0,8 (0,6 - 1)	0,8 (0,6 - 0,9)	0,6 (0,4 - 0,8) <sup>b</sup>	0,7 (0,6 - 0,9) <sup>d</sup>	0,8 (0,5 - 0,9)

IL - 6 – plazmatická hladina

CA 125 – sérová hladina

D / P kreatinin – poměr hladiny kreatininu v plazmě a dialyzátu ve 4. hodině peritoneálního ekvilibračního testu

p – hladina významnosti

a –  $p < 0,05$  1E vs 1P

b –  $p < 0,005$  1E vs 1P

c –  $p < 0,05$  6E vs 6P

d –  $p < 0,05$  6E vs 6P

e -  $p < 0,05$  12E vs 12P

Tabulka 8 - Souhrnná data E vs. P

	Extraneal	Physioneal	p
	median (min - max)	median (min - max)	hladina významnosti
<b>Leukocyty</b> ( $10^6/l$ )	10,9 (1,1 – 65,2)	7,9 (2,1 - 27)	< 0,05
<b>Makrofágy</b> ( $10^6/l$ )	6,1 (0 – 46,9)	2,5 (0,7 – 17,6)	< 0,05
<b>Mezoteliální buňky</b> ( $10^6/l$ )	0,3 (0 – 2,1)	0,1 (0 – 0,5)	< 0,05
<b>Mezoteliální buňky DR MESF</b>	2220,5 (875 - 3449)	1182 (506 - 8046)	< 0,05
<b>eff IL - 6</b> (ng/l)	76,9 (25,2 – 588,5)	43,2 (21,3 – 93,4)	NS
<b>AR IL - 6</b> (pg/min)	320,5 (73,2 – 3133,6)	141,2 (0 – 202,3)	< 0,05
<b>eff CA 125</b> (IU/l)	39,5 (14 – 134,1)	34,1 (12,8 – 70,3)	NS
<b>AR CA 125</b> (IU/min)	159,6 (56 – 357,6)	84,3 (36,3 – 199,7)	< 0,05

eff IL - 6 – dialyzátová hladina

eff CA 125 – dialyzátová hladina

NS – nesignifikantní (not significant)

MESF – fluorescenční intenzita měřená jednotkami MESF

DR and IL-6R – exprese markerů aktivovaných zánětem

Tabulka 9 - Korelační analýza souhrnných dat skupiny E

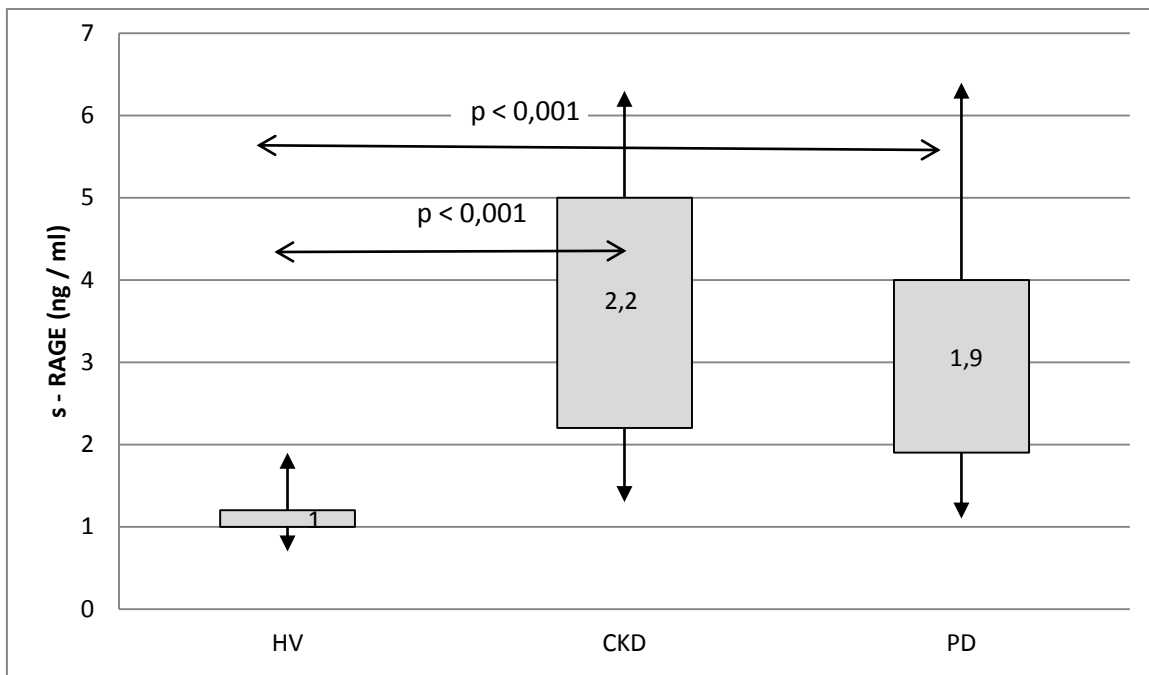
	eff IL - 6 (ng/l)	eff CA 125 (IU/l)	AR IL - 6 (pg/min)	AR CA 125 (IU/min)
	r, p	r, p	r, p	r, p
<b>Leukocyty</b> ( $10^6/l$ )	r = 0,588, p < 0,05	r = 0,677, p < 0,001	r = 0,517, p < 0,05	r = 0,673, p < 0,001
<b>Granulocyty</b> ( $10^6/l$ )	r = 0,432, p < 0,05	r = 0,447, p < 0,05	NS	NS
<b>Makrofágy</b> ( $10^6/l$ )	r = 0,53, p < 0,05	r = 0,623, p < 0,005	NS	r = 0,53, p < 0,05
<b>Makrofágy DR MESF</b>	r = - 0,673, p < 0,005	NS	r = - 0,728, p < 0,001	r = - 0,635, p < 0,005
<b>Mezoteliální buňky DR MESF</b>	NS	NS	NS	NS
<b>Mezoteliální buňky IL-6R MESF</b>	NS	NS	NS	NS

r – korelační koeficient

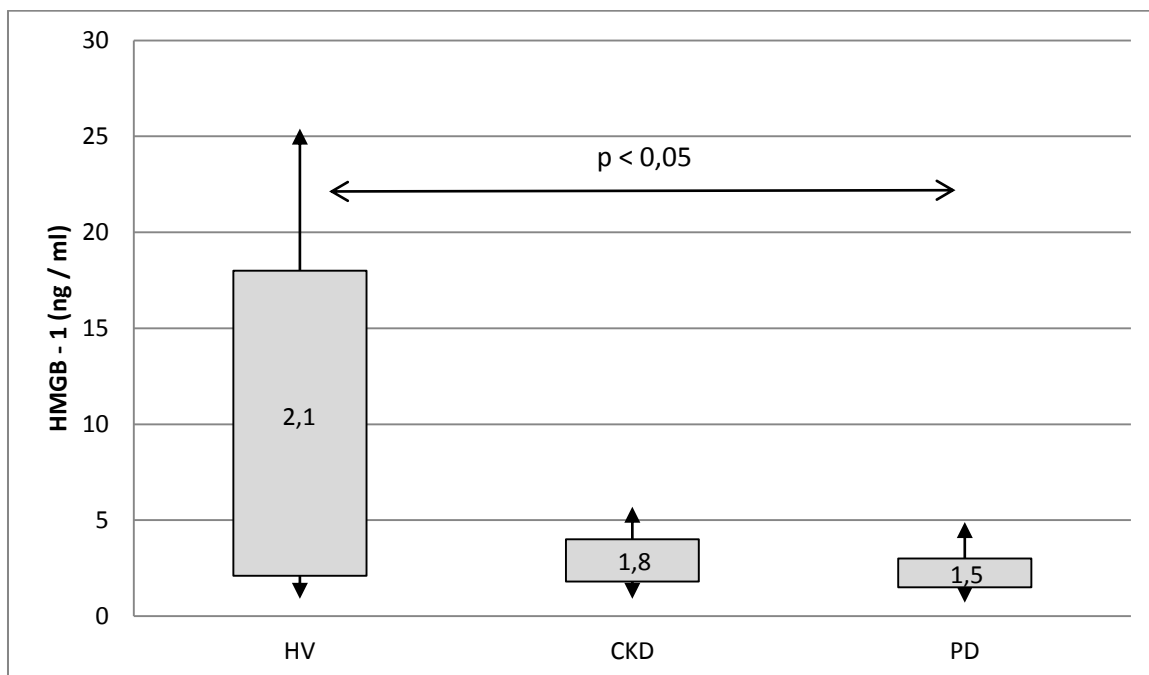
p – hladina významnosti

NS – nesignifikantní

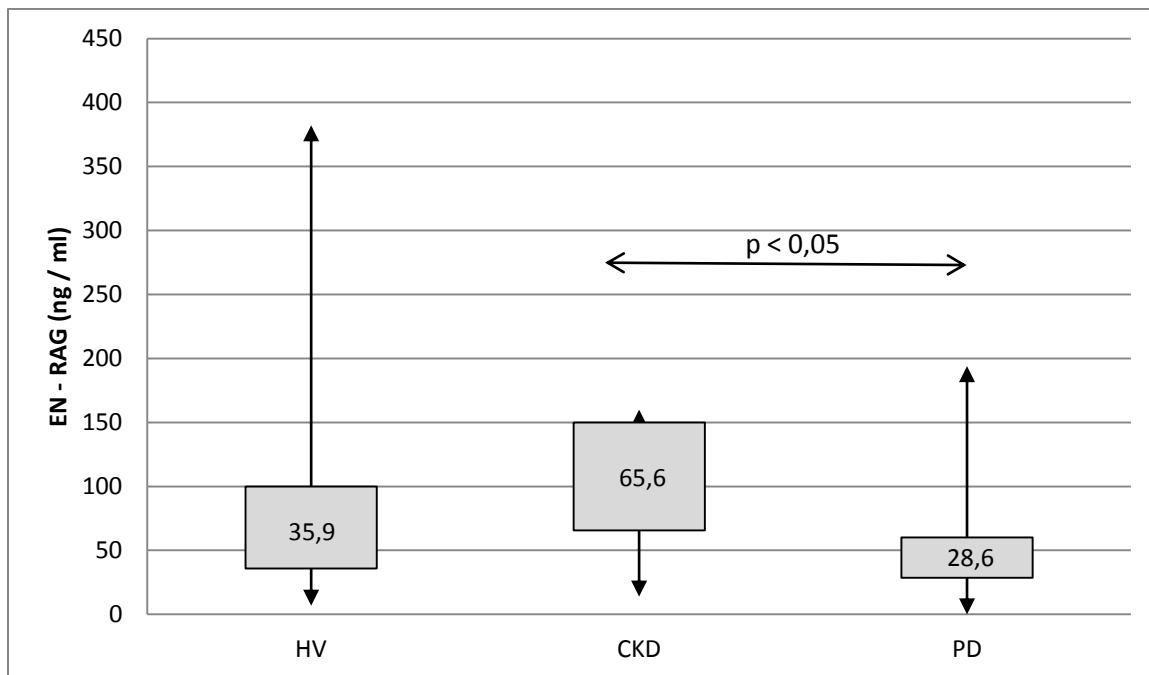
Graf 1 - Srovnání plazmatických hladin s - RAGE mezi skupinami HV, CKD a PD pacientů



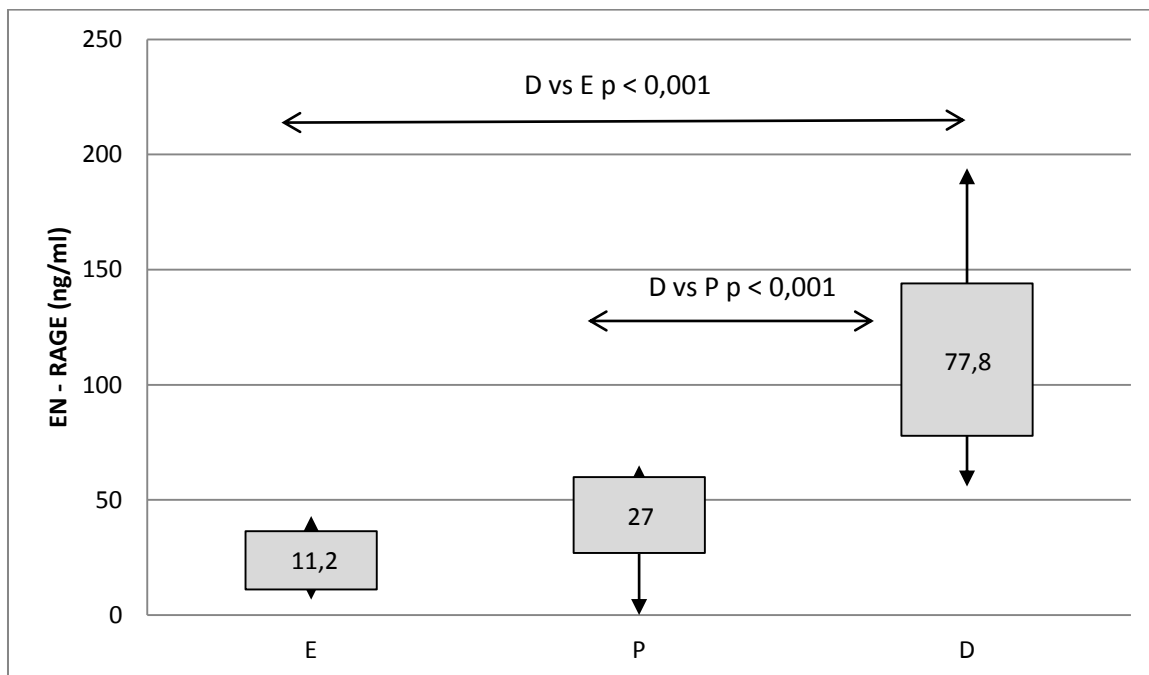
Graf 2 - Srovnání plazmatických hladin HMGB - 1 mezi skupinami HV, CKD a PD pacientů



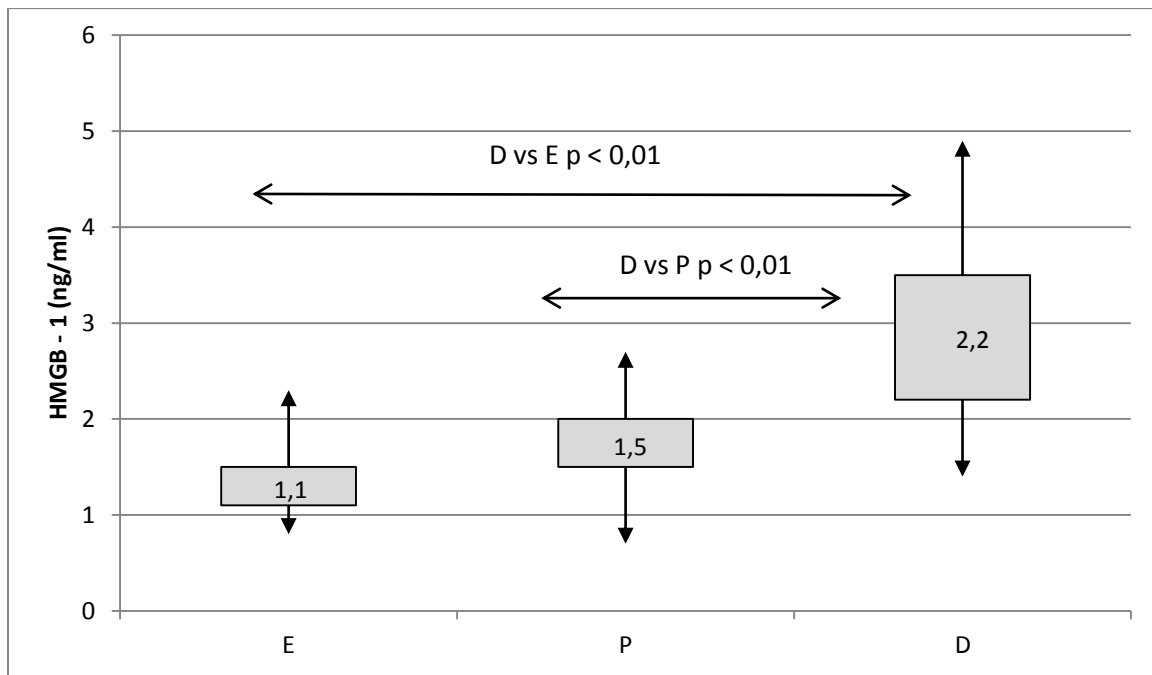
Graf 3 - Srovnání plazmatických hladin EN-RAGE mezi skupinami HV, CKD a PD pacientů



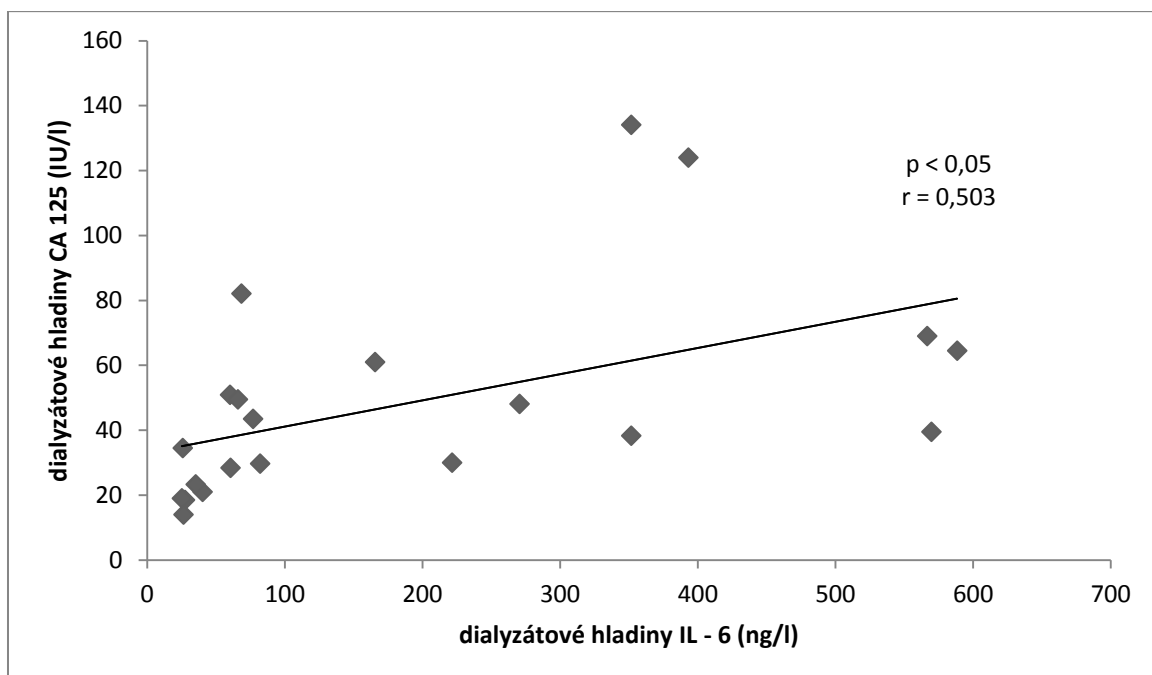
Graf 4 - Srovnání plazmatických hladin EN - RAGE mezi skupinami E, P, D



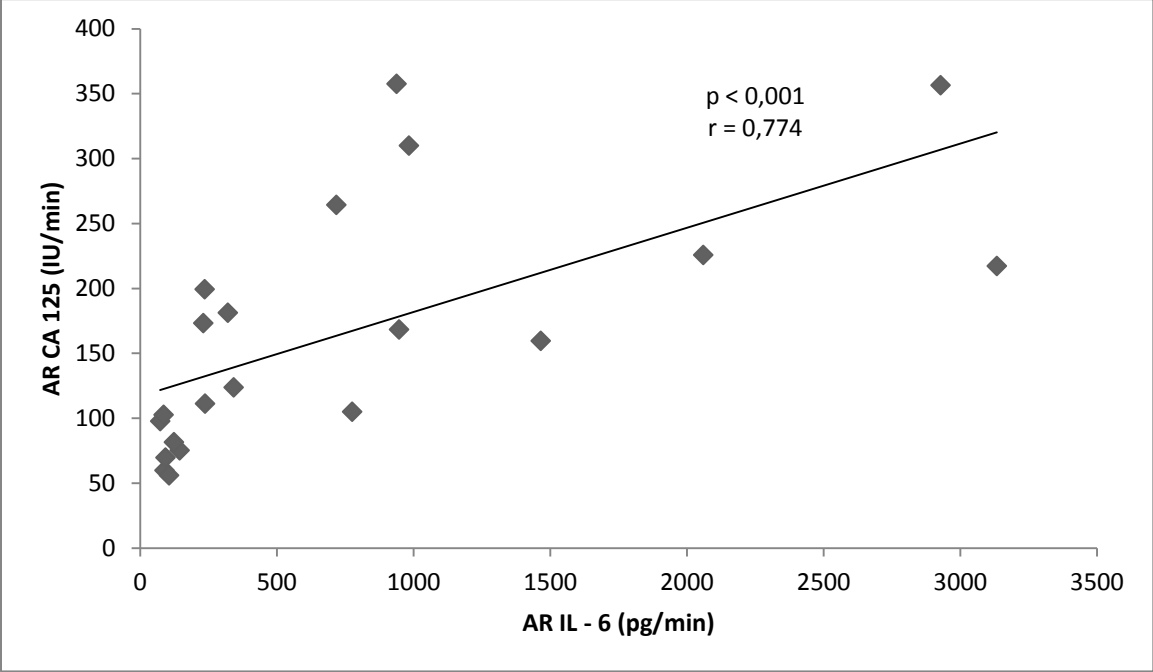
Graf 5 - Srovnání plazmatických hladin HMGB - 1 mezi skupinami E, P, D



Graf 6 - Dialyzátové hladiny IL - 6 and CA 125 u Extranealu



Graf 7 - Appearance rate IL – 6 a CA 125 u Extranealu



## **11 ORIGINALNÍ PRÁCE, KTERÉ JSOU SOUČÁSTÍ DIZERTAČNÍ PRÁCE**