

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



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

MUDr. Markéta Kratochvilová

2016

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: **Biochemie a patobiochemie**

Předseda oborové rady: **Prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.**

Školící pracoviště: **Klinika nefrologie VFN a 1. LF UK Praha**

Školitel: **Prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc., MBA, FASN, FERA**
Klinika nefrologie VFN a 1. LF UK Praha

Konzultant: **Prof. MUDr. Marta Kalousová, Ph.D.**
Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN
a 1. LF UK Praha

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
1. Úvod	6
2. Hypotézy a cíle práce	7
2.1. Klinicko-laboratorní studie	7
2.2. Experimentální studie	7
3. Materiál a metodika	7
4. Výsledky	10
4.1. Klinicko-laboratorní studie	10
4.2. Experimentální studie	14
5. Diskuse	15
6. Závěr	18
7. Použitá literatura	19
8. Přehled publikací autora	22

Abstrakt

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

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

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

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

1. Úvod

Patogeneze celé řady onemocnění a jejich komplikací souvisí s oxidačním a karbonylovým stresem, který je již delší dobu velmi častým předmětem mnoha výzkumů nejen v oblasti medicíny. Neenzymatická glykace, oxidační a karbonylový stres, funkce ledvin, obrat proteinů a potrava jsou faktory, které mohou ovlivňovat hladinu AGEs v organismu (1). AGEs hrají důležitou roli v patogenezi mnoha onemocnění. Jedním z mechanismů uplatnění AGEs je jeho působení přes receptor pro AGEs (RAGE - Receptor for Advanced Glycation End products) (2). RAGE je schopen vázat kromě AGEs i modifikované lipoproteiny o nízké hustotě, amyloid β peptid, amfoterin (HMGB1) a některé zástupce rodiny S 100 proteinů (3). Solubilní forma RAGE (sRAGE), zkrácená forma RAGE, postrádající transmembránovou oblast, reprezentuje přirozeně se vyskytující inhibitor účinků zprostředkovaných RAGE (4; 5). Patologické působení AGEs je možné ovlivnit inhibicí jejich tvorby, stimulací jejich degradace či blokováním receptoru RAGE (6; 7). Glomerulonefritidy vznikají v důsledku aktivace imunitních mechanismů, většinou, ale ne vždy, se zánětlivými změnami v glomerulech. V případě sekundárních forem je glomerulární postižení jedním z projevů systémového onemocnění.

Podocyty, nebo-li glomerulární viscerální epiteliální buňky, jsou vysoce specializované buňky s jedinečnou lokalizací a architekturou. Buněčné kultury dnes patří mezi jedny z nejčastějších biologických modelů využívaných ve výzkumu. Jako první popsali izolaci a primární kultivaci renálních podocytů již v roce 1954 Krakower a Greenspon (8). Některé z těchto experimentálních technik jsou, i když ve změněné formě, užívány do dnes. Mundel a spol. pozorovali především konverzi „cobblestones“ (nediferencovaných a proliferujících podocytů) do „arborizovaných“ buněk, které jsou více podobné podocytům in vivo, i když se nejedná o terminálně diferencované buňky. Z nezralých fetálních ledvin je možné získat primární kultury lidských fetálních podocytů, které bývají zpravidla zdrojem immortalizovaných podocytárních buněčných linií. Většina terminálně diferencovaných buněk vykazuje pouze omezenou proliferační schopnost (9). Bylo zjištěno, že podocyty mohou být přítomny i v moči (10). Přítomnost podocalyxin pozitivních buněk v moči byla prokázána u celé řady experimentálních i lidských glomerulárních onemocnění (11). Vogelmann a spol. byli první, kteří úspěšně kultivovali lidské močové buňky, které byly identifikovány jako podocyty a následovaly další práce (12; 13).

2. Hypotézy a cíle práce

2.1. Klinicko-laboratorní studie

1. Sledování markerů oxidačního stresu, se zaměřením na AGEs, u pacientů s onemocněním ledvin. Hledání vztahu sérových hladin AGEs k typu nefropatie a funkci ledvin.
2. Sledování sérových hladin AGEs u pacientů s chronickým onemocněním ledvin v souvislosti s nutricí, anemií a mikrozánětem.
3. Sledování vlivu funkce ledvin na sérové hladiny sRAGE u pacientů s chronickým onemocněním ledvin.

2.2. Experimentální studie

1. Sjednocení technik vhodných ke kultivaci podocytů užívaných jak v minulosti tak v současnosti, se zaměřením na nejčastěji užívané metody. Zavedení a osvojení si nejvhodnější metody kultivace nejen primokultur, ale i imortalizovaných podocytů v našich podmínkách.
2. Nalezení praktické a rychlé metody stanovování podocytů v moči a sledování vztahu podocyurie s proteinurií a aktivitou onemocnění.

3. Materiál a metodika

Pacienti a kontroly

AGEs u nefropatií s mírnou renální insuficiencí

Vyšetřili jsme 60 pacientů se čtyřmi typy nefropatií. 18 s lupusovou nefritidou (3 muže a 15 žen, střední věk 30 ± 5 let), 17 s IgA nefropatií (10 mužů a 7 žen, střední věk 34 ± 14 let), 16 s membranózní nefropatií (8 mužů a 8 žen, střední věk 58 ± 15 let) a 9 s ANCA asociovanou vaskulitidou (4 muže a 5 žen, střední věk 49 ± 14 let), kteří měli sérové hladiny kreatininu $< 200 \mu\text{mol/l}$, byli vyšetřeni v klinicky stabilizovaném stavu. V kontrolní skupině bylo 15 jedinců s normální renální funkcí, bez přítomnosti onemocnění ledvin (6 mužů a 9 žen, střední věk 44 ± 11 let).

Asociace AGEs s nutričními parametry a anemií u pacientů s chronickým onemocněním ledvin

Bylo vyšetřeno 159 pacientů s různým stupněm renální insuficience a 44 zdravých jedinců jako kontrolní skupina. Etiologie chronického onemocnění ledvin byla následující:

ANCA asociovaná vaskulitida (20%), hypertenzní nefropatie (8%), lupusová nefritida (14%), IgA nefropatie (21%), diabetická nefropatie (4%), membranózní nefropatie (15%), fokálně segmentární glomeruloskleróza (FSGS) nebo minimální změny (11%), amyloidóza (5%) a ostatní (1%). Pacienti byli rozděleni do pěti skupin dle výše glomerulární filtrace - eGFR (MDRD). Z lékařské dokumentace jednotlivých pacientů byla zjištěna anamnéza kardiovaskulárního onemocnění. Většina pacientů užívala medikaci, která je běžná při chronické renální insuficienci (diuretika, antiagregancia, kalcium a vitamin D, statiny či antihypertenziva).

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

Skupina pacientů s chronickým onemocněním ledvin, bez nutnosti náhrady funkce ledvin, čítala 25 pacientů. U osmi pacientů byla stanovena diagnóza IgA nefropatie, dále u pěti pacientů ANCA asociovaná vaskulitida, u dvou hypertenzní nefropatie, u dvou diabetická nefropatie, u dvou kombinace hypertenzní nefropatie a diabetické nefropatie u dvou kombinace hypertenzní nefropatie a chronické tubulointersticiální nefritidy, u tří membranózní nefropatie a u jednoho pacienta polycystická choroba ledvin. Tři z těchto pacientů byli léčeni kortikosteroidy, čtyři kombinací kortikosteroidů a cyklofosfamidu a dva pacienti kombinací kortikosteroidů a chlorambucilu. Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 21 zdravých jedinců (9 mužů, 12 žen, střední věk 59 ± 7 let).

Vzorky krve pro stanovení AGEs i sRAGE a rutinní vyšetření byly pacientům a kontrolní skupině odebírány punkcí kubitální žíly. Odběry krve byly prováděny u pacientů na lačno. Všechny vzorky krve byly centrifugovány po dobu 10 minut při 1450 ot./min (u AGEs u nefropatií s mírnou renální insuficiencí 3000 ot./min), při teplotě 4°C. Sérum bylo uchováváno při teplotě -80 °C. Analýza vzorků byla provedena do šesti měsíců po odběru.

Všichni vyšetření podepsali informovaný souhlas. Studie byly schváleny lokální etickou komisí. V době studie pacienti neužívali žádné speciální potravinové přídatky.

U pacientů s renální insuficiencí, byla současně sbírána moč za 24 hodin.

Stanovení laboratorních parametrů:

Při měření fluoreskujících AGEs jsme použili spektrofluorometr – Fluoromax-3, Jobin Yvon Horiba, USA, bylo měřeno emisní spektrum 375-515 nm při excitaci 350nm a stanovena fluorescenční intenzita v emisním maximu ~ 435 nm. Intenzita fluorescence je vyjádřena v arbitrárních jednotkách (arbitrary units AU) (14).

Solubilní formu RAGE v séru jsme analyzovali pomocí nekompetitivní sandwich ELISA metody (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Intenzita zbarvení byla změřena pomocí spektrofotometru při vlnové délce 450/570 nm. Používali jsme kit výrobce Quantikine; RD Systems, Minneapolis. Koncentrace sRAGE ve vzorcích byly odečítány z kalibrační křivky pomocí softwaru „Genesis“. Minimální detekční dávka sRAGE byla 4,12 pg/ml. Koncentrace RAGE byly dány v pikogramech na mililitr (pg/ml).

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

Použité statistické analýzy

V práci AGEs u nefropatií s mírnou renální insuficiencí byla k vyhodnocení rozdílů mezi skupinami použita metoda ANOVA.

Při zjišťování vztahů mezi AGEs, nutričními parametry a anémií u pacientů s chronickým onemocněním ledvin byl použit software Statistics Toolbox™ MATLAB® (The MathWorks™, Inc.). Srovnání mezi skupinami bylo provedeno pomocí nepárových *t*-testů a ANOVA pro spojitě proměnné s normálním rozdělením. Mann-Whitneyovým *U* testem a Kruskal-Wallisovou ANOVA metodou pro proměnné s jinými rozdělovacími funkcemi. Vztah mezi analyzovanými parametry byl stanoven pomocí Spearmanova nebo Pearsonova korelačního koeficientu.

U sledování vlivu funkce ledvin na hladiny sRAGE u chronických onemocnění ledvin jsou výsledky vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka a v případě vysoké interindividuální variability, jako medián a kvantilové rozpětí. K vyhodnocení rozdílů mezi skupinami byl použit Mannův-Whitneyův test a *t*-test. Vztahy mezi parametry byly stanoveny užitím Pearsonových a Spearmanových korelačních koeficientů.

Kultivace podocytů

Aplikovali jsme postup dle Mundela a spol. (15) s několika modifikacemi. Získaná ledvina potkana kmene Wistar (samci, 150-170g, stáří 8 až 9 týdnů) byla asepticky podélně rozříznuta a pomocí nůžek oddělena kůra od dřene, po dezintegraci kůry na kousky velké cca 1mm³ jsme následně kortikální část ledviny prosívali sérií sítok o velikosti pórů 250, 150 a 75 μm (tzv. „sieving method“). Získané glomeruly jsme promíchávali s roztokem HBSS s antibiotiky a rovnoměrně rozlévali do falkon (cca 25-40 ml). Následovala centrifugace a rozlití centrifugátu do kultivačních lahví na fibronektin a kultivace v termostatu po dobu 48 hod. Poté jsme pozorovali vrstvu buněk („monolayer“), následovalo pasážování.

K uvolnění buněk jsme využívali enzymatickou disociaci a první pasáž byla nasazena do kultivačních lahví potažených kolagenem typu I, při dalších pasážích jsme buňky pokládali i na plastický povrch. Výměna kultivačního média byla prováděna 3x týdně. K počítání buněk jsme používali Bürkerovu komůrku, k odlišení živých a mrtvých buněk jsme používali roztok trypanové modři. Podobně jsme kultivovali i imortalizované humánní podocyty „wild types“ z Heidelbergu – h63. Po dosažení konfluency buněk, většinou po cca 3-7 ti dnech kultivace jsme buňky stanovovali imunocytochemicky, se zaměřením na anti WT-1 a anti synaptopodin.

Vyšetření podocytů v moči

Vyšetření moči jsme provedli u tří pacientů s diagnózou FSGS, u jednoho s IgA nefropatií, u jednoho s IgM nefropatií a u jedné zdravé kontroly. Současně jsme u všech vyšetřili moč chemicky, močový sediment, sérový kreatinin a proteinurii z 24 hodinového sběru moče.

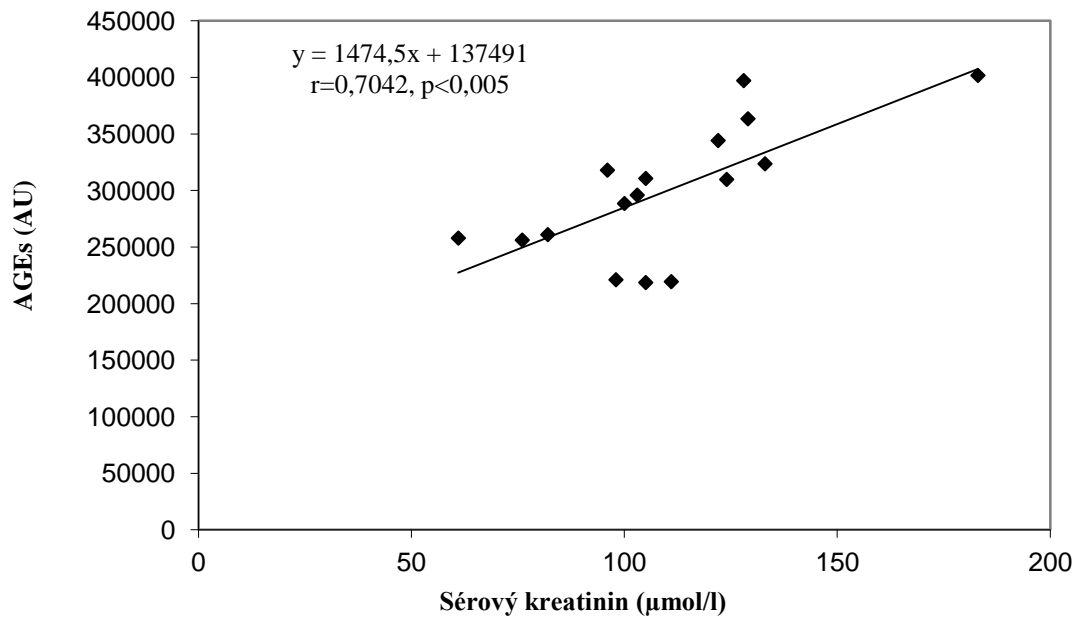
Používali jsme ultrafiltry firmy Millipore (filtr Ultrafree-CL s membránou Durapore® o velikosti pórů 5 µm). Gatování buněk určených k analýze jsme prováděli pomocí značení jader propidium jodidem. Ke značení podocytů jsme používali monoklonální protilátku proti podocalyxinu značenou phycoerythrinem (R&D Systems). Druhou použitou byla monoklonální protilátka proti cytokeratinům 6, 8, 18 a 19, značená FITC. Metodou průtokové cytometrie jsme získali výsledky v grafické a číselné formě (průtokový cytometr FACS Calibur firmy Becton Dickinson). Počítačovou analýzou po označení monoklonálními protilátkami následně procházely pouze živé buňky, definované v PI gatu.

4. Výsledky

4.1. Klinicko-laboratorní studie

AGEs u nefropatií s mírnou renální insuficiencí

Hladiny AGEs u pacientů s různými typy nefropatií a sérovou hladinou kreatininu < 200 µmol/l se signifikantně nelišily od zdravých kontrol. Nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v hladinách AGEs mezi jednotlivými typy nefropatií s normální nebo mírně zvýšenou hladinou kreatininu. Byla nalezena signifikantní korelace mezi sérovými hladinami kreatininu a AGEs u pacientů s lupusovou nefritidou ($r=0,4863$, $p<0,05$) a u pacientů s IgA nefropatií ($r=0,7042$, $p<0,005$) (Graf 1).

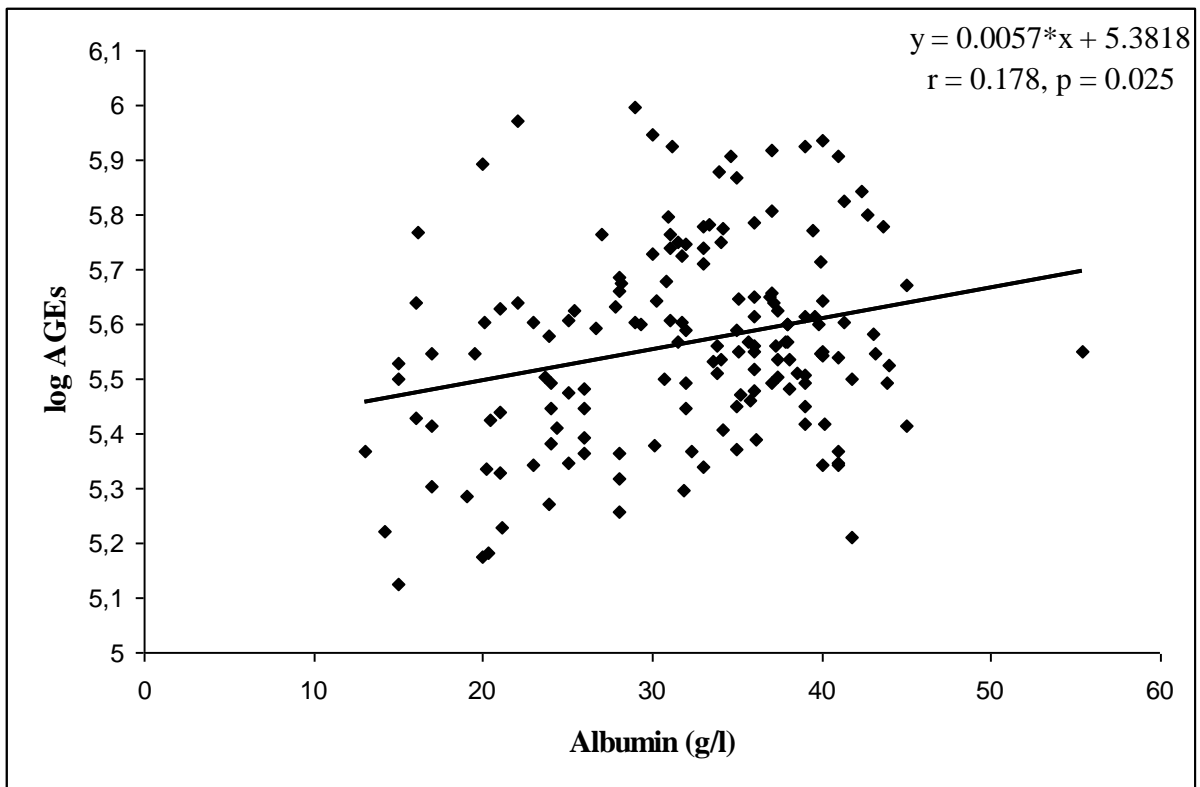


Graf 1: Korelace sérových hladin kreatininu a AGEs u pacientů s IgA nefropatií

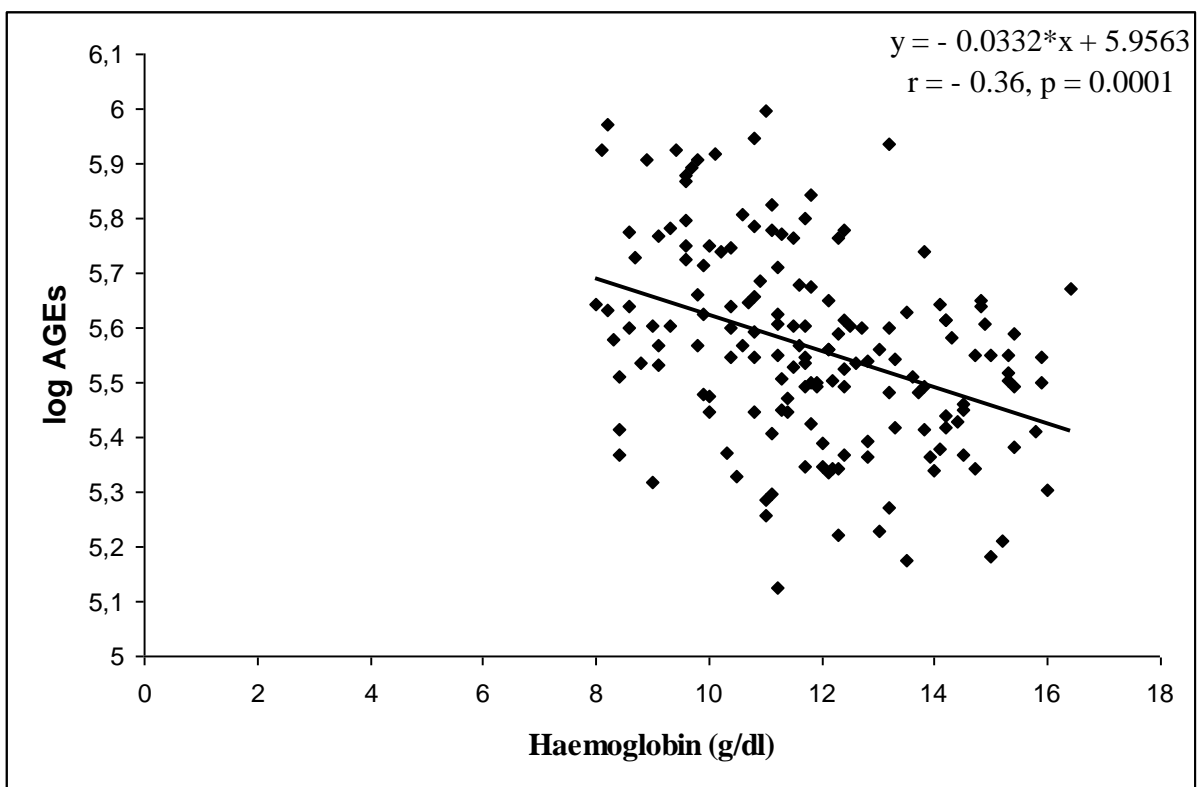
Asociace AGEs s nutričními parametry a anémií u pacientů s chronickým onemocněním ledvin

V práci týkající se asociace AGEs s nutričními parametry a anémií byly v různých stádiích CKD střední sérové koncentrace AGEs $3,9 \pm 1,7 \times 10^5$ AU. Sérové koncentrace AGEs byly zvýšeny u skupin pacientů od stádia CKD 3 ($3,7 \pm 1,4 \times 10^5$ AU, $p < 0,0001$), podobně jako sérové hladiny orosomukoidu ($1,25 \pm 0,56$ g/l, $p < 0,0001$). Pacienti s různým stupněm CKD s pozitivní anamnézou kardiovaskulárního onemocnění měli podobné hodnoty sérových hladin AGEs jako pacienti bez přítomnosti kardiovaskulárního onemocnění. Podobně nebyly pozorovány rozdíly v sérových hladinách AGEs u pacientů s různým stupněm CKD a současně s DM či bez něj. Statisticky signifikantně korelovaly sérové hladiny AGEs s věkem ($r = 0,206$, $p = 0,009$), albuminem ($r = 0,178$, $p = 0,025$) (Graf 2), prealbuminem ($r = 0,45$, $p = 0,0001$), orosomukoidem ($r = 0,269$, $p = 0,001$); a inverzně s eGFR ($r = -0,517$, $p = 0,0001$) a taktéž s hemoglobinem ($r = -0,36$, $p = 0,0001$) (Graf 3).

Po vztažení na věk byla signifikantní korelace AGEs pozorována u albuminu ($p = 0,0006$), prealbuminu ($p < 0,0001$) a hemoglobinu (inverzně $p < 0,0001$). Nezávislý vztah sérových hladin AGEs byl nalezen u eGFR ($R^2 = 0,45$).



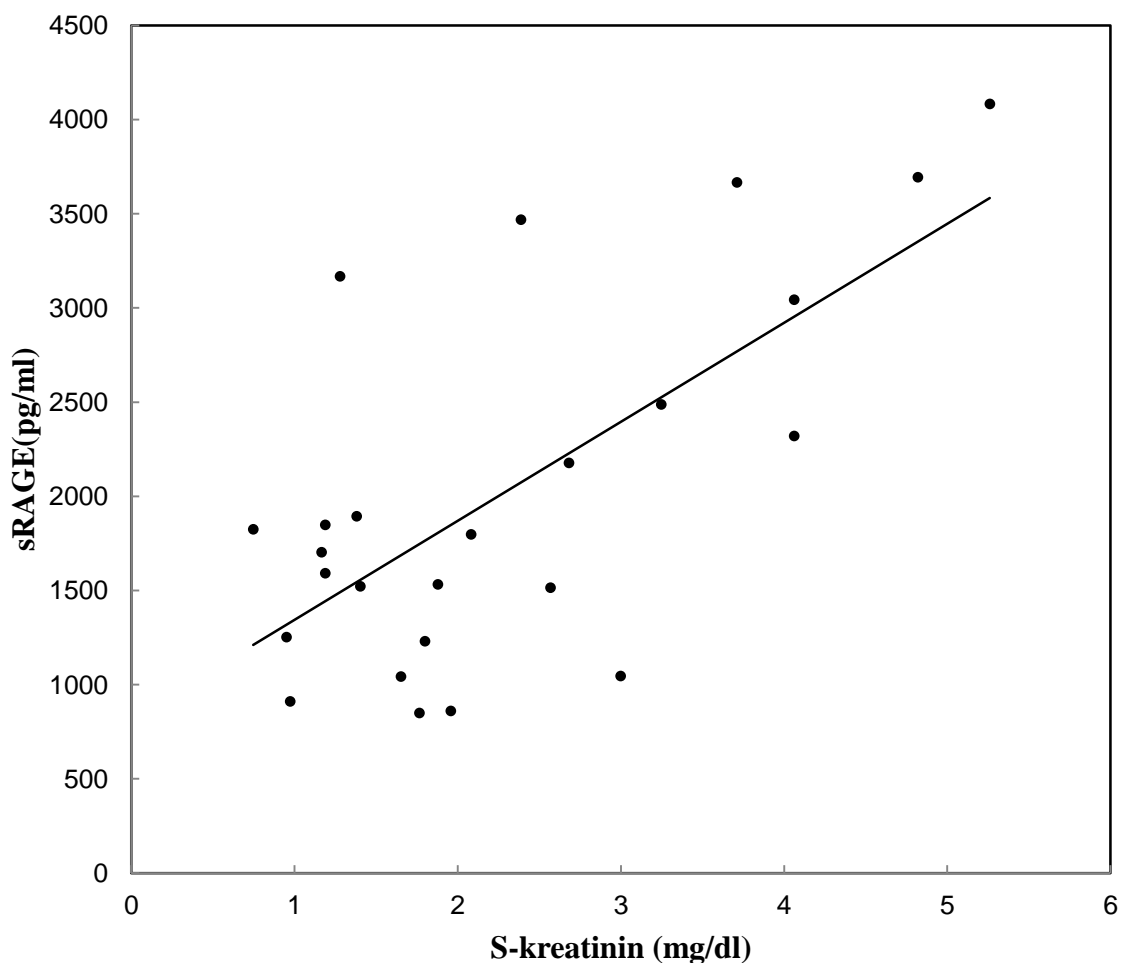
Graf 2: Logaritmická korelace AGEs s albuminom u pacientů s CKD 1-5



Graf 3: Logaritmická korelace AGEs s hemoglobinem u pacientů s CKD 1-5

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

U pacientů s chronickým onemocněním ledvin s různým stupněm renální insuficience korelovaly sérové hladiny sRAGE signifikantně pozitivně s koncentrací sérového kreatininu ($r=0,50$; $p<0,05$) (Graf 4) a negativně s reciproční hodnotou glomerulární filtrace ($r=0,53$; $p<0,05$), vztah kreatininové clearance je hyperbolický. U pěti pacientů s nálezem nefropatie bylo sRAGE detekováno i ve vzorcích moči (25; 64; 1,027; 54 a 102 pg/ml) a u čtyř z těchto pacientů byla přítomna těžká proteinurie ($>3,5$ g/24 hod). U ostatních pacientů s hladinou sRAGE v moči nižší než je detekční limit, byla proteinurie nižší než 2 g/24hod.



Graf 4: Korelace sérových hladin sRAGE s koncentrací sérového kreatininu

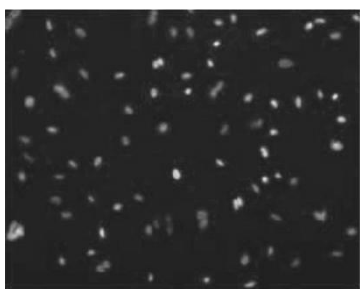
Poznámka ke grafu 4: publikováno v AJKD, Vol 47, No 3 (March), 2006: pp 406-411

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

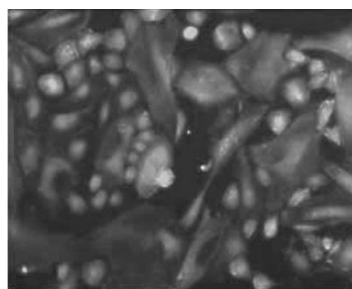
4.2. Experimentální studie

Kultivace podocytů

Glomeruly z ledvin potkana kmene Wistar jsme získali pomocí „sieving method“ se závěrečným použitím sítko o velikosti pórů 75 μ m. Počáteční rozrůstání buněk probíhalo na fibronectinu, při pasážování jsme používali kolagen typu I a, sledovali jsme také rozrůstání buněk pouze na plastovém povrchu. Před prvním pasážováním jsme pod fázovým mikroskopem pozorovali směs glomerulárních buněk a i oblasti s buňkami podobnými „cobblestones“. V dalších pasážích bylo možné pozorovat dlouhé „arborizované“ buňky. Buňky jsme počítali po označení jader propidium jodidem v komůrce. Osvojili jsme si také techniku kultivace imortalizovaných podocytů, jejichž získání je snažší a jistota, že se jedná o podocyty je téměř sto procentní. Pomocí imunocytochemie jsme stanovovali několik proteinů typických pro podocyty. Zaměřili jsme se především na WT-1, jehož pozitivita je typicky nukleární a synaptopodin, kde je lokalizace cytoplazmatická (Obr. 1 a 2).



Obr. 1 *Expres WT-1 – nukleární pozitivita - 2. pasáž na kolagenu typu I, ředění primární protilátky 1:20, sekundární protilátky 1:50.*



Obr. 2 *Expres synaptopodinu – cytoplazmatická, cytoskeletální lokalizace – 2.pasáž na kolagenu typu I, ředění primární protilátky 1:100, sekundární protilátky 1:50.*

Vyšetření podocytů v moči

Po označení monoklonálními protilátkami proti podocalyxinu a cytokeratinu jsme metodou průtokové cytometrie stanovovali močové podocyty. Úmyslem užití minimálně dvou znaků, bylo odlišit případné podocyty od ne-epiteliálních buněk v sedimentu. Hodnotitelných výsledků jsme začali dosahovat až po optimalizaci přípravy močového sedimentu. Dvojitě pozitivní buňky byly s velkou pravděpodobností podocyty. Jednoho pacienta s významnou proteinurií a aktivní glomerulonefritidou jsme vyšetřili dvakrát. Vstupně byla jeho proteinurie 4,87g/24hod a metodou průtokové cytometrie bylo nalezeno celkem 24 podocytů. Po 14ti dnech imunopresivní terapie jsme opět vyšetřili pacientovu moč, došlo pouze k minimálnímu poklesu proteinurie (4,2g/den), ale cytometricky došlo k poklesu na 14 podocytů v moči.

5. Diskuse

Klinicko-laboratorní studie

Klíčová role AGEs během glomerulárního a tubulointersticiálního poškození či při komplikacích u pacientů s renální insuficiencí je nadále podrobně zkoumána, stejně tak jejich role v účasti na lokální a zánětlivé odpovědi v ledvinné tkáni (16). V naší práci jsme pozorovali, podobně jako v jiných pracích, inverzní vztah sérových hladin AGEs a glomerulární filtrace. Významné zvýšení sérových hladin AGEs u pacientů s nefropatiemi a s normální nebo mírně zvýšenou sérovou hladinou kreatininu jsme v naší práci nenalezli. Nebyly také nalezeny signifikantní rozdíly v hladinách AGEs mezi různými typy nefropatií, i když mají rozdílnou patogenezi. Zvýšení sérových hladin AGEs u pacientů s renální insuficiencí není tedy pouze následkem jejich sníženého vylučování ledvinami, ale též následkem zvýšeného oxidačního a karbonylového stresu a snížením antioxidační ochrany enzymů a jejich kofaktorů (Zn, Se, vitaminy). Obecně tedy u pacientů s diabetes mellitus a chronickým onemocněním ledvin (CKD), zejména u pacientů léčených hemodialýzou či peritoneální dialýzou, jsou přítomny podmínky podporující tvorbu AGEs (17; 18). V naší práci jsme rozdíly mezi sérovými hladinami AGEs u pacientů s CKD a DM, či bez něj, nenalezli, interpretace těchto výsledků je jistě ovlivněna malým počtem diabetiků (14%) zařazených do naší studie. Na rozdíl od diabetiků nekorelují u pacientů s CKD sérové hladiny AGEs se sérovou hladinou Amadoriho produktu fruktosaminu a jejich vznik tedy není vysvětlen jako důsledek hyperglykémie a klasické Maillardovy reakce (19).

Oxidační stres jako následek excesivní produkce volných kyslíkových radikálů nebo nízké hladiny antioxidantů je důležitým faktorem pro rozvoj endoteliální dysfunkce a aterogeneze (20). U pacientů s CKD, kteří ještě nebyli dialyzováni jsme rozdíly v sérových hladinách AGEs, v případě přítomnosti nebo absence kardiovaskulárního onemocnění, nenalezli. Postižení ledvin, spojené právě s AGEs, bylo popsáno nejen při diabetické nefropatii či chronickém renálním selhání, ale i chronickém zánětu, vyšším příjmu AGEs a stárnutí (21; 22). U pacientů s CKD, bez nutnosti náhrady funkce ledvin, jsme našli pozitivní vztah AGEs s věkem, albuminem, prealbuminem a orosomukoidem a negativní vztah AGEs s eGFR a hemoglobinem. Naše výsledky svědčí o tom, že u pacientů s různými typy nefropatií existuje vzájemné ovlivnění mezi renálními funkcemi, nutričními parametry, zánětem a hladinami AGEs. Cirkulující AGEs jsou jednoznačně v určitém smyslu propojeny s plazmatickými proteiny, především albuminem (23) a akumulace AGEs v plazmatických proteinech by mohla být přisuzována snížení renální clearance proteinů spojenými s AGEs.

Korelaci sérových hladin AGEs s proteinurií jsme nenalezli. Zvýšené hladiny AGEs s velkou pravděpodobností vedou ke zvýšení proteinurie u pacientů s CKD. Nízké hladiny albuminu, prealbuminu a transferinu se podílí na aktivaci zánětu (24). Sérové hladiny CRP a orosomukoidu jsou ovlivněny přítomností chronického onemocnění ledvin (25), podobně jako jsou AGEs jedním z parametrů dlouhodobě probíhajícího oxidačního poškození (26). V naší práci jsme vztah mezi sérovými hladinami AGEs a CRP nenalezli, pravděpodobně vzhledem k vysoké inter-individuální variabilitě, ale našli jsme vztah sérových hladin AGEs a orosomukoidu. Současně jsme prokázali zvýšení hladin AGEs a orosomukoidu se snižující se renální funkcí, jako jednoho z dalších potvrzujících faktorů mikrozářetu a oxidačního stresu u pacientů s CKD. Bylo zjištěno, že vzestup sérových hladin AGEs nebyl závislý na BMI, nebyl také zjištěn statisticky významný rozdíl mezi skupinou obézních a neobézních nemocných s CKD nebo chronicky hemodialyzovaných (27). Podobně jako v práci Thomase et al. (28) jsme i my našli vztah mezi klesající hladinou hemoglobinu a AGEs. Není zřejmé, jakým způsobem hladiny hemoglobinu ovlivňují právě produkci nebo clearance AGEs, ale podobně jako hemoglobin, tak i AGEs, patří mezi markery postižení ledvin. Je známo, že anemie u pacientů s CKD je známkou zvýšeného rizika progresu renálního onemocnění, hospitalizace a předčasné smrti (29). Je pravděpodobné, že AGEs by mohly přispívat k určitému riziku nutričních abnormalit a anémii spojené s renálním postižením. Naše studie byla limitovaná vzhledem k tomu, že byla pouze observační a tudíž neumožňovala sledovat jednoznačné příčiny, současně nebyl u našich pacientů stanovován příjem AGEs dietou.

Zvýšení sérových hladin sRAGE, související se zvýšením AGEs, působí tedy jako ochrana proti toxickému působení AGEs, kdy v případě reakce AGEs s RAGE dochází k intracelulární tvorbě ROS a následně k aktivaci MAPK a NF- κ B (30; 31). Z prvních prací, zabývajících se tímto tématem, vyplývá, že určitý vliv poruchy funkce ledvin na hladiny sRAGE existuje, ale pacienti s onemocněním ledvin byli z těchto studií vyloučeni (32; 33). V naší práci bylo poprvé prokázáno, že hladiny sRAGE se zvyšují u pacientů se sníženou renální funkcí nezávisle na příčině renálního onemocnění.

Experimentální studie

Selhání funkce podocytů se podílí na rozvoji glomerulosklerózy, která je pozorována u celé řady progredujících renálních onemocnění (34). Přehledný souhrnný článek, který byl věnován výhradně kulturačním metodám podocytů pochází z roku 1996 (35). Od té doby se objevila celá řada nových informací a novelizujících technologických postupů v této oblasti.

Předpokládá se, že technikou sérií sítěk se oddělí parietální vrstva glomerulárních buněk, čímž se odkryjí viscerální glomerulární buňky (podocyty) a je umožněno jejich rozrůstání. Někteří autoři zpochybňují stejnorodost glomerulárních buněčných kultur při této klasické přípravě (36) a proto získávali glomeruly pouze pomocí dvou sítěk, s velikostí pórů 250 a 75 μm , aby nedošlo k poškození podocytů (37). V naší práci jsme získávali glomeruly metodou s použitím 3 sítěk o velikosti pórů 250, 150 a 75 μm a získali jsme tedy především dekapulované glomeruly, z nichž vyrůstali „cobblestones“ a následně i arborizované buňky. Přítomnost enkapsulovaných glomerulů se při této metodě vyloučit nedala. Imunocytochemicky jsme stanovovali znaky podocytů tehdy, jakmile na námi používaném kolagenu typu I dosahovaly konfluence a relativně rychle proliferovaly ve srovnání s plastickým povrchem. Podobně tomu bylo i v jiné práci, kde popsali, že proteiny extracelulární matrix, jako např. kolagen I nebo IV, usnadňují proliferaci indukovanou EGF a ostatními růstovými faktory u kultivovaných podocytů (38). Po pěti dnech růstu, exprimovaly běžné podocytární znaky jako WT-1, stejně jako znak diferencovaných podocytů např. synaptopodin. Hlavní problémy spojené s irreverzibilně immortalizovanými buněčnými liniemi spočívaly v tom, že buňky proliferovali, ale bez tendence diferencovat (39). Díky daru z mnichovského pracoviště jsme mohli pracovat i s těmito buněčnými liniemi podocytů. Je však třeba si uvědomit, že tyto buňky reprezentují především experimentální model s vysokým stupněm možnosti vzniku artefaktů. ’

Velmi důležitou známkou aktivity glomerulárního onemocnění je detekce proteinurie, ta však neurčí, zda se jedná o dlouhodobější či právě probíhající poškození. Kultivace podocytů z moče je jistě mnohem přesnější, avšak vzhledem k náročnosti metody se nejedná o nejjednodušší a nejrychlejší metodu, což bylo naším primárním cílem. Nejvhodnějším markerem identifikace podocytů v moči se zdá být podocalyxin, který je lokalizován na apikálním povrchu buňky (10). Podocyty jsou poškozeny u mnoha forem glomerulárního onemocnění, například minimálních změn, FSGS, membránózní nefropatie, diabetické nefropatie a lupusové nefritidy (40). V novějších pracích bylo popsáno, že moč pacientů s glomerulonefritidami kromě podocytů obsahuje též podocytární fragmenty (tzv. PPGS – podocalyxin positive granular structure), které rovněž reflektují stupeň podocytárního poškození (41). Na rozdíl od proteinurie, která informuje spíše o míře poškození filtrační membrány, podocyturie přetrvává i po odeznění patologického působení, vzhledem k tomu, že je přítomen defekt ve filtrační membráně. Podocyturie je tedy citlivým indikátorem aktivity onemocnění (42). Užití této metody má celou řadu výhod – není invazivní a vyšetření je možné opakovat dle potřeby a bez zatížení pacienta.

6. Závěr

Klinicko-laboratorní studie

- Nepozorovali jsme signifikantní zvýšení sérových hladin AGEs u pacientů s různými typy nefropatií a s normální nebo mírně zvýšenou hladinou kreatininu, nenalezli jsme také signifikantní rozdíly v sérových hladinách AGEs mezi jednotlivými typy nefropatií, i když mají rozdílnou patogenezi. Hladina AGEs závisí více na renální funkci než na typu nefropatie.
- Hlavním zjištěním byla pozitivní korelace hladin albuminu a prealbuminu a negativní korelace hemoglobinu se sérovými hladinami AGEs u pacientů s CKD ve stádiu 1-5, s různými typy nefropatií, bez nutnosti náhrady funkce ledvin. Rozdíly mezi sérovými hladinami AGEs u pacientů s CKD a DM, či bez něj jsme nenalezli. Pozorovali jsme, že nízký hemoglobin a nutriční parametry významně ovlivňují sérové hladiny AGEs u pacientů s CKD. Vztah mezi sérovými hladinami AGEs a CRP u pacientů s CKD nalezen nebyl, pravděpodobně vzhledem k výrazné inter-individuální variabilitě, ale prokázali jsme současné zvýšení sérových hladin AGEs a orosomukoidu (potvrzujícího faktoru mikrožánětu) se snižující se renální funkcí.
- Poprvé jsme prokázali, že sérové hladiny sRAGE se zvyšují u pacientů se sníženou renální funkcí nezávisle na příčině renálního onemocnění a že hladiny sRAGE stoupají s renálním poškozením, a jsou nejvyšší u pacientů s renálním selháním.

Experimentální studie

- Kultivace podocytů s možností jejich dalšího využití v pokusech je velmi důležitou součástí výzkumu onemocnění ledvin. Podařilo se nám nalézt a osvojit si techniky a postupy kultivace nejen primokultur, ale i immortalizovaných podocytů, které jsme následně pozorovali mikroskopicky a identifikovali imunocytochemicky.
- Z našich vyšetření vyplývá, že podocyturie souvisí s proteinurií, ale jednoznačně s ní nekoreluje. Je významně ovlivněna aktivitou onemocnění, odráží tedy závažnost glomerulárního patologického procesu a současně je ovlivněna dobou trvání diagnózy. Ztráta podocytů do moči je limitována dlouhodobým onemocněním, vzhledem k poklesu celkového počtu podocytů v ledvinách.

7. Použitá literatura

1. **Kalousová M.** Patobiochemie ve schématech. 1. Vyd. Praha: Grada, 2006.
2. **Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM.** Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 May;4(5):285-93.
3. **Herold K, Moser B, Chen Y, et al.** Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in a dash to the rescue inflammatory signals gone awry in the primal response to stress. *Leukoc Biol.* 2007 Aug;82(2):204-12.
4. **Schlueter C, Hauke S, Flohr AM, Rogalla P, Bullerdiek J.** Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms-a result of regulated alternative splicing? *Biochim Biophys Acta.* 2003 Oct 20;1630(1):1-6.
5. **Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P, Bianchi ME.** A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J.* 2008 Oct, 22(10):3716-27.
6. **Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP.** AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res.* 1998 Mar;37(3):586-600.
7. **Khalifah RG, Baynes JW, Hudson BG.** Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Apr;257(2):251-8.
8. **Krakower CA, Greenspon SA.** Factors leading to variation in concentration of nephrotoxic antigen(s) of glomerular basement membrane. *AMA Arch Pathol.* 1954 Nov;58(5):401-32.
9. **Jat PS, Sharp PA.** Large T antigens of simian virus 40 and polyomavirus efficiently establish primary fibroblasts. *J Virol.* 1986 Sep;59(3):746-50.
10. **Hara M, Yamamoto T, Yanagihara T, Takada T, Itoh M, Adachi Y, Yoshizumi A, Kawasaki K, Kihara I.** Urinary excretion of podocalyxin indicates glomerular epithelial cell injuries in glomerulonephritis. *Nephron.* 1995;69(4):397-403.
11. **Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, Koide H.** Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2000 Sep;15(9):1379-83.
12. **Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV.** Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Jul;285(1):F40-8.
13. **P, Mundel.** Urinary podocytes: lost and found alive. *Kidney Int.* 2003 Oct;64(4):1529-30.
14. **Kalousová M, Zima T, Tesař V, Škrha J, Štípek S.** Stanovení produktů pokročilé glykace a oxidace. *Klin. Biochem. Metab.,* 10(31), 2002, No. 1, p. 11-16.
15. **Mundel P, Reiser J, Kriz W.** Induction of differentiation in cultured rat and human podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8(5):697-705.

16. **Ishibashi Y, Yamagishi S, Matsui T, Ohta K, Tanoue R, Ueda S, Nakamura K, Okuda S.** Pravastatin inhibits advanced glycation end products (AGEs)-induced proximal tubular cell apoptosis and injury by reducing receptor for AGEs (RAGE) level. *Metabolism*. 2012 Aug;61(8):1067-72.
17. **Daroux M, Prévost G, Maillard-Lefebvre H, Gaxatte C, D'Agati VD, Schmidt AM, Boulanger E.** Advanced glycation-end products: implications for diabetic and non-diabetic nephropaties. *Diabetes Metab*. 2010 Feb;36(1):1-10.
18. **Kalousova M, Zima T, Tesar V, Dusilova-Sulkova S, Skrha J.** Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. *Mutat Res*. 2005 Nov 11;579(1-2):37-46.
19. **Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C.** Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications. *Kidney Int Suppl*. 2000 Aug;76:S120-5.
20. **Halliwell B.** The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*. 1993 Mar;23 Suppl 1:118-26.
21. **Wautier JL, Schmidt AM.** Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res*. 2004;95:233-238.
22. **Semba RD, Ferrucci L, Fink JC, et al.** Advanced glycation end products and their circulating receptors and level of kidney function in older community-dwelling women. *Am J Kidney Dis*. 2009;53:51-58.
23. **Miyata T, Fu MX, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Thorpe SR, Baynes JW.** Autoxidation products of both carbohydrates and lipids are increased in uremic plasma: is there oxidative stress in uremia? *Kidney Int*. 1998;54:1290-1295.
24. **Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergström J.** Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15:953-960.
25. **Romão JE Jr, Haiashi AR, Elias RM et al.** Positive acute-phase inflammatory markers in different stages of chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2006;26:59-66.
26. **Kalousová M, Sulková S, Fialová L, et al.** Glycoxidation and inflammation in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:2577-2581.
27. **Marečková O, Teplan V, Kalousová M, Zima T, Lecián D, Skibová J, Viklický O.** Solubilní receptor pro konečné produkty pokročilé glykace u oběžních nemocných s chronickým onemocněním ledvin. *Aktuality v nefrologii*. 2008, roč. 14, č. 1, s. 15-19.
28. **Thomas MC, Tsalamandris C, MacIsaac R, et al.** Low-molecular-weight AGEs are associated with GFR and anemia in patients with type 2 diabetes. *Kidney Int*. 2004;66:1167-1172.
29. **McClellan WM, Flanders WD, Langston RD, Jurkovitz C, Presley R.** Anemia and

renal insufficiency are independent risk factors for death among patients with congestive heart failure admitted to community hospitals: a population-based study. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:1928-1936.

30. **Wendt T, Tanji N, Guo J , et al.** Glucose, glycation, and RAGE: implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14 (5) 1383-1395.

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

32. **Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, et al.** Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in non-diabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 May;25(5):1032-7.

33. **Pullerits R, Bokarewa M, Dahlberg L, Tarkowski A.** Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(4):R817-24.

34. **Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M.** Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* 2003;83:253-307.

35. **Mundel P, Kriz W.** Cell culture of podocytes *Exp Nephrol* 1996;4:263-266.

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

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

38. **Cybulsky AV, McTavish AJ, Cyr MD.** Extracellular matrix modulates epidermal growth factor receptor activation in rat glomerular epithelial cells. *J Clin Invest.* 1994 Jul;94(1):68-78.

39. **Delarue F, Virone A, Hagege J, Lacave R, Peraldi MN, Adida C, Rondelu E, Feunteun J, Sraer JD.** Stable cell line of T-SV40 immortalized human glomerular visceral epithelial cells. *Kidney Int.* 1991 Nov;40(5):906-12.

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

41. **Hara M1, Yanagihara T, Kihara I, Higashi K, Fujimoto K, Kajita T.** Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: a novel phenomenon of podocyte injury. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Feb;16(2):408-16.

42. **Yu D, Petermann AT, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, Floege J.** Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Jun;16(6):1733-41.

8. Přehled publikací autora

Publikace, které jsou podkladem dizertační práce

a) s IF

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

b) bez IF

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

Publikace bez vztahu k tématu disertační práce

a) s IF

- Tesar V, **Kazderova M**, Hlavackova L.: Rokitansky and his first description of polyarteritis nodosa. *J Nephrol.* 2004 Jan-Feb;17(1):172-4. (IF 1,338)
- Kalousova M., Soukupova J., Mestek O., Hodkova M., **Kazderova M.**, Benakova H., Bezdicková D., Fialova J., Dusilova-Sulkova S., Tesar V., Zima T.: Matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and cardiovascular status of hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.*, Congress 8.-13.11.2005 Philadelphia, Book of Abstracts: 858A. (IF 7,240)

- Vojtova L, Zima T, Tesar V, **Kazderova M.**: Study of urinary proteomes in patients with nephrotic syndrome. *Folia Biol (Praha)*. 2007;53(2):58-65. (IF 0,596)
- Marta Kalousova, Marie Jachymova, Oto Mestek, Magdalena Hodkova, **Marketa Kazderova**, Vladimir Tesar, Tomas Zima. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) - soluble form (sRAGE) and gene polymorphisms in chronic hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Jul;22(7):2020-6. (IF 3,167)
- **Kazderova M**, Jancova E, Rysava R, Merta M, Tesar V. Mycophenolate mofetil in low doses stabilizes and improves antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis and lupus nephritis. *Arch Med Res*. 2008 Jan;39(1):115-9. (IF 1,772)
- Peiskerova M., **Kratochvilova M.**, Kalousova M., Tesar V., Zima T. et al. FGF-23 in chronic kidney diseases. *Kidney Blood Press Res*. 2009;32(4):276-83. (IF ,714)
- Oskar Zakiyanov, Marta Kalousova, **Marketa Kratochvilova**, Vítězslav Kříha, Tomas Zima, and Vladimir Tesar. Determinants of Circulating Matrix Metalloproteinase-2 and Pregnancy-Associated Plasma Protein-A in Patients with Chronic Kidney Disease. *Clin.Lab*.2012;58:471-480. (IF 0,904)
- Zakiyanov O, Kalousova M, **Kratochvilova M**, Kriha V, Zima T, Tesar V. Changes in levels of matrix metalloproteinase-2 and -9, pregnancy-associated plasma protein-A in patients with various nephropathies. *J Nephrol*. 2013 May-Jun;26(3):502-9. (IF 2,015)

b) bez IF

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

Přiložené publikace

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