

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Dorota Formanowicz

**Studium teoretyczne i kliniczne  
wybranych aspektów miażdżycy  
ze szczególnym uwzględnieniem zmian  
obserwowanych u pacjentów  
z przewlekłą chorobą nerek**

Poznań 2013

*Tytuł angielski*

Theoretical and clinical study of selected aspects of atherosclerosis with particular emphasis on the changes observed in patients with chronic kidney disease

*Recenzja wydawnicza*

Prof. dr hab. Maria Pioruńska-Stolzmann

*Korekta wydawnicza*

Janina S. Rogalińska

*Skład, łamanie i projekt okładki*

Bartłomiej Wąsiel

© Copyright by Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,  
Poznań 2013

© Copyright by Dorota Formanowicz, Poznań 2013

ISBN 978-83-7597-212-2

WYDAWNICTWO NAUKOWE UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO  
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU  
ul. Bukowska 70, 60-812 Poznań  
[www.wydawnictwo.ump.edu.pl](http://www.wydawnictwo.ump.edu.pl)

Ark. wyd. 16,5. Ark. druk. 17,1.

Format B5. Zam. 111/13.

Druk ukończono w czerwcu 2013 r.

*Adasiowi, Ani, Andrzejkowi i Agnieszce  
moim najdroższym Dzieciom*



# Spis treści

Objaśnienia skrótów stosowanych w tekście .....	7
1. Wstęp .....	11
2. Klasyczne podejście do badania procesu powstawania i rozwoju miażdżycy .....	17
2.1. Rys historyczny badań procesu powstawania i rozwoju miażdżycy .....	17
2.2. Aktualny stan wiedzy na temat wybranych aspektów powstawania i rozwoju miażdżycy .....	21
2.2.1. Ogólna charakterystyka procesu miażdżycy .....	21
2.2.2. Wybrane aspekty patofizjologii dysfunkcji śródbłonna naczyniowego .....	22
2.2.3. Udział stresu oksydacyjnego w inicjowaniu i rozwoju miażdżycy .....	26
2.2.4. Udział procesów zapalnych i immunologicznych w inicjowaniu i rozwoju miażdżycy .....	32
2.3. Odrębności miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek .....	38
3. Systemowe podejście do badania procesu powstawania i rozwoju miażdżycy .....	43
3.1. Podstawowe idee biologii i medycyny systemowej .....	43
3.2. Wybrane zagadnienia związane z modelowaniem procesów biologicznych za pomocą sieci Petriego .....	46
3.2.1. Wprowadzenie do teorii sieci Petriego .....	46
3.2.2. Własności behawioralne i strukturalne sieci Petriego .....	52
3.2.3. Niezmienniki miejsc i tranzycji oraz sposoby ich analizy .....	53
4. Cele pracy .....	63
5. Materiał i metody .....	64
5.1. Charakterystyka badanej populacji .....	64
5.2. Metodyka badań .....	76
5.2.1. Badania laboratoryjne .....	76
5.2.2. Badania proteomiczne .....	78
5.2.3. Ocena grubości i blaszki miażdżycowej .....	82
5.2.4. Badania systemowe .....	82
5.2.5. Analizy statystyczne .....	85
6. Wyniki .....	86
6.1. Badania laboratoryjne .....	86

6.1.1. Profil lipidowy .....	86
6.1.2. Stan zapalny .....	87
6.1.3. Stres oksydacyjny .....	100
6.1.4. Ocena ryzyka sercowo-naczyniowego .....	118
6.2. Badania proteomiczne .....	121
6.2.1. Wstępne wyniki .....	121
6.2.2. Wyniki głównych badań proteomicznych przeprowadzonych w ramach grantu. Wyniki częściowo opublikowane [188] ...	126
6.3. Ocena grubości blaszki miażdżycowej .....	132
6.4. Badania systemowe .....	133
6.4.1. Udział stresu oksydacyjnego w powstawaniu i rozwoju miażdżycy .....	133
6.4.1.1. Model udziału stresu oksydacyjnego w powstawaniu i rozwoju miażdżycy oparty na sieciach Petriego ...	133
6.4.1.2. Opis modelu udziału stresu oksydacyjnego w powstawaniu i rozwoju miażdżycy .....	137
6.4.1.3. Analiza modelu udziału stresu oksydacyjnego w powstawaniu i rozwoju miażdżycy .....	140
6.4.2. Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego w aspekcie miażdżycy .....	147
6.4.2.1. Model dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w miażdżycy oparty na sieciach Petriego .....	147
6.4.2.2. Opis modelu dysfunkcji śródbłonna naczyniowego .	150
6.4.2.3. Analiza modelu dysfunkcji śródbłonna naczyniowego .....	152
7. Dyskusja .....	155
8. Wnioski .....	180
9. Streszczenie .....	181
10. Summary .....	183
11. Piśmiennictwo .....	185

## Objaśnienia skrótów stosowanych w tekście

ADMA	asymetryczna dimetylarginina – ang. asymmetric dimethylarginine
apo	apolipoproteina – ang. apolipoprotein
BMI	wskaźnik masy ciała – ang. body mass index
BH4	tetrahydrobiopteryna – ang. tetrahydrobiopterin
CCR2	C-C chemokinowy receptor typ 2 – ang. C-C chemokine receptor type 2
CD	antygen zróżnicowania – ang. cluster of differentiation
CD40L	ligand dla antygeny zróżnicowania 40 – ang. cluster of differentiation 40 ligand
CE	estry cholesterolu – ang. cholesteryl esters
CERP	białko regulujące wypływ cholesterolu – ang. cholesterol efflux regulatory protein (inna nazwa: ABCA1)
CETP	białko przenoszące estry cholesterolu – ang. cholesterol ester transport protein
CHAOS	badanie dotyczące działania witaminy E u osób z chorobą niedokrwienną mięśnia sercowego – ang. Cambridge Heart Antioxidant Study
CM	chylomikrony – ang. chylomicrons
CMR	chylomikrony resztkowe – ang. chylomicron remnants
CoA	koenzym A – ang. Coenzyme A CRP białko C-reaktywne – ang. C-reactive protein
DAMP	wzorce molekularne związane z niebezpieczeństwem/uszkodzeniem (endogenne alarminy – ang. danger/damage associated molecular patterns)
DDAH	dimetylaminohydrolaza dimetyloargininowa – ang. dimethylarginine dimethylaminohydrolase
2DE	dwukierunkowe (dwuwymiarowe) rozdziały elektroforetyczne – ang. 2-dimensional electrophoresis
eGFR	wielkość filtracji kłębuszkowej oszacowana na podstawie wzoru MDRD – ang. estimated glomerular filtration rate
ESL-1	ligand 1 dla selektyny E – ang. E-selectin ligand-1
ESRD	schyłkowa niewydolność nerek – ang. end-stage renal disease
ET-1	endotelina 1 – ang. endothelin 1
FC	wolny (niezestryfikowany) cholesterol – ang. free cholesterol

HD	hemodializa – ang. hemodialysis
HDL	lipoproteiny o dużej gęstości – ang. high density lipoproteins
HMG-CoA	3-hydrokso-3-metyloglutarylo-koenzym A – ang. 3-hydrokso-3-methyl-glutaryl-coenzyme A HO-1 oksygenaza hema 1 – ang. heme oxygenase-1
HOPE	badanie dotyczące działania ramiprylu i witaminy E – ang. The Heart Outcomes Prevention Evaluation
HPS	badanie dotyczące wpływu działania simwastatyny na częstość występowania incydentów sercowo-naczyniowych – ang. The Heart Protection Study
HSP	białka szoku cieplnego – ang. heat shock proteins
ICAM-1	cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 – ang. intracellular adhesion molecule 1
IDL	lipoproteiny o pośredniej gęstości – ang. intermediate density lipoproteins
IEF	ogniskowanie izoelektryczne – ang. isoelectrophocusing
IFN- $\gamma$	interferon gamma – ang. interferon gamma
IL	interleukina
IMT	grubość kompleksu błona wewnętrzna-błona środkowa – ang. intima-media thickness
IPG	immobilizowany gradient pH – ang. immobilizing PH gradient
iNOS	indukowalna syntaza tlenku azotu – ang. inducible nitric oxide synthase
Kt/V	wskaźnik adekwatności dializy – ang. dialysis index
LDL	lipoproteiny o bardzo małej gęstości – ang. low density lipoproteins
LDL-R	receptory wątrobowe dla lipoprotein o bardzo małej gęstości ang. low density lipoproteins receptors
LIP	pula wolnego żelaza – ang. labile iron pool
LOX-1	receptor podobny do lektyny typu 1 wiążący utlenione LDL ang. lectin-like oxidized LDL receptor-1
LPL	lipaza lipoproteinowa – ang. lipase lipoprotein
LPS	lipopolisacharyd – ang. lipopolysaccharide
MALDI-TOF-MS	spektrometr masowy z jonizacją przez desorpcję laserową w stałej matrycy z analizatorem czasu przelotu – ang. matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry
MCT	maksymalne zbiory wspólnych trajycji – ang. maximal common transitions sets
MCP-1	białko chemotaktyczne monocytów 1 – ang. monocyte chemotactic protein 1



M-CSF	czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów – ang. macrophage colony-stimulating factor
MD-2	szpikowe białko różnicowania 2 – ang. myeloid differentiation
MDRD	badanie oceniające wpływ diety na progresję choroby nerek, w którym dodatkowo stworzono wzór o tej samej nazwie służący do określania wielkości przesączania kłębuszkowego ang. Modification of Diet in Renal Disease
mm-LDL	minimalnie zmodyfikowane lipoproteiny o bardzo małej gęstości – ang. minimal modified low density lipoproteins
MMPs	metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej – ang. matrix metalloproteinases
MPO	mieloperoksydaza – ang. myeloperoxidase
NF-κB	czynnik jądrowy κB zidentyfikowany w limfocytach B – ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	komórki NK – ang. natural killer
NO	tlenek azotu – ang. nitric oxide
NOS	syntaza tlenku azotu – ang. nitric oxide synthase
Nt-proBNP	N końcowy fragmentu prohormonu peptydu natriuretycznego typu B – ang. N-terminal pro-brain natriuretic peptide
ox-LDL	utlenione lipoproteiny o bardzo małej gęstości – ang. oxidized low density lipoproteins
PAF	czynnik aktywujący płytki – ang. platelet-activating factor
PAMPs	mikroorganizmy patogenne o konserwowanej ewolucyjnie budowie (egzogenne alarminy) – ang. pathogen-associated molecular patterns
PChN	przewlekła choroba nerek – ang. chronic kidney disease
PDGF	płytkowy czynnik wzrostu – ang. platelet-derived growth factor
PECAM-1	płytkowo-śródbłonkowa cząsteczka adhezyjna 1 – ang. platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PMF	masowy odcisk palca peptydu – ang. peptide mass fingerprinting
PON	paraoksonaza – ang. paraoxonase
PPAR-γ	receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów gamma – ang. peroxisome proliferator activated receptor gamma
PPR	receptor rozpoznający wzorce molekularne – ang. pattern recognition receptor
PRMT	metyltransferaza białkowa – ang. protein methyltransferase
PSGL-1	glikoproteinowy ligand 1 P-selektyny – ang. P-selectin glycoprotein ligand-1

RANK	receptor aktywujący jądrowy czynnik NF- $\kappa$ B – ang. receptor activator of nuclear factor NF- $\kappa$ B
RANKL	ligand receptora aktywującego jądrowy czynnik NF- $\kappa$ B – ang. receptor activator of nuclear factor NF- $\kappa$ B ligand
RANTES	chemokina RANTES – ang. Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
RNS	reaktywne formy azotu – ang. reactive nitrogen species
ROS	reaktywne formy tlenu – ang. reactive oxygen species
SDS-Page	elektroforeza dwukierunkowa przeprowadzona w obecności siarczanu dodecylu sodu – ang. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SHARP	badanie oceniające korzyści z obniżenia stężenia cholesterolu u chorych z przewlekłymi chorobami nerek – ang. Study of Heart and Renal Protection
SMCs	komórki mięśni gładkich – ang. smooth muscle cells
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa – ang. superoxide dismutase
SPACE	badanie dotyczące stosowania witaminy E w dawce 800 IU/dzień u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek – ang. the Secondary Prevention with Antioxidants of Cardiovascular Disease in End-Stage renal Disease
SR	receptor zmiatający – ang. scavenger receptor
TAG	triglicerydy – ang. triacylglyceroles
TCR	receptor komórek T, receptor obecny na powierzchni limfocytu T – ang. T cell receptor
TF	czynnik tkankowy – ang. tissue factor
TIMPs	tkankowe inhibitory metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej – ang. tissue inhibitors of matrix metalloproteinases
TLR	receptor podobny do białka Toll – ang. Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	czynnik martwicy nowotworów alfa – ang. tumor necrosis factor-alpha
TNF- $\beta$	czynnik martwicy nowotworów beta – ang. tumor necrosis factor-beta
UPGMA	nieważone grupowanie par metodą wykorzystującą średnie arytmetyczne – ang. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
VLDL	lipoproteiny o bardzo małej gęstości – ang. very low density lipoproteins
VCAM-1	naczyniowa cząsteczka przylegania komórkowego 1 – ang. vascular adhesion molecule 1
VLA-4 vWF	bardzo późny antygen 4 – ang. very late antigen 4 czynnik von Willebranda – ang. von Willebrand factor

# 1. Wstęp

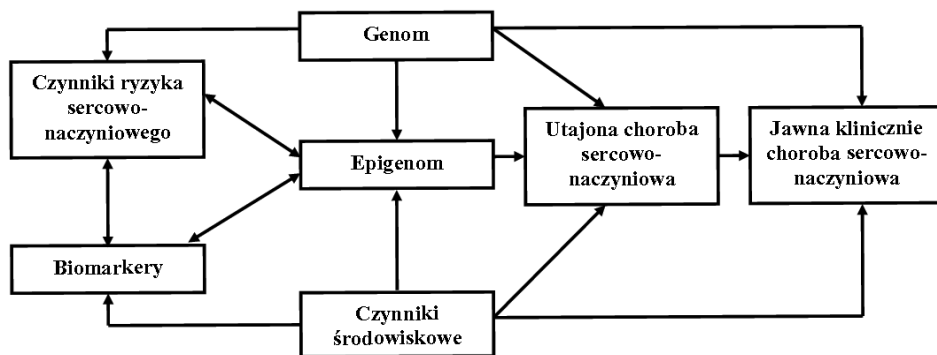
Pomimo niekwestionowanego postępu, jaki dokonał się w zakresie poznania patomechanizmów leżących u podłoża miażdżycy, ciągle wiemy jeszcze zbyt mało, aby móc w pełni skutecznie jej zapobiegać, a tym bardziej, aby móc wyleczyć dotkniętych nią chorych.

Choć w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat zmiany w zakresie stylu życia, zastosowanie nowoczesnych leków oraz wdrożenie nowych standardów postępowania w sposób zdecydowany poprawiły sytuację epidemiologiczną na świecie w zakresie zapadalności, śmiertelności oraz umieralności z powodu chorób sercowo-naczyniowych, to ciągle stanowią one wyzwanie dla współczesnej medycyny. Zgodnie z danymi epidemiologicznymi Światowej Organizacji Zdrowia, w 2005 roku liczba zgonów spowodowanych chorobami sercowo-naczyniowymi o podłożu miażdżycowym stanowiła 30,2% wszystkich światowych zgonów [22]. Szacuje się, że obecność uznanych wspólnie wieńcowych czynników ryzyka pozwala wyjaśnić wystąpienie choroby niedokrwiennej serca, której główną przyczynę stanowi miażdżycy, jedynie u połowy chorych. Natomiast u pozostałych osób, pomimo modyfikacji tradycyjnych czynników ryzyka, na razie nie udaje się zahamować ani tym bardziej cofnąć postępu miażdżycy [163]. Problem ten wydaje się być jeszcze bardziej złożony, jeżeli obok tradycyjnych czynników ryzyka występują czynniki ryzyka nietradycyjne, takie jak np. toksyny mocznicowe, albuminuria, zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej, późne produkty zaawansowanej glikacji białek, nasilony stres oksydacyjny, nasilony proces zapalny, jak ma to miejsce w przypadku przewlekłej choroby nerek (PChN). Według niektórych naukowców istnieje ponad 200 czynników ryzyka miażdżycy, które należałoby uwzględnić w naszych strategiach postępowania, a ich liczba, w miarę dokonującego się na naszych oczach postępu technologicznego, stale rośnie. Ta odkrywana coraz większa złożoność uświadamia badaczom, że ciągle jesteśmy dalecy od pełnego zrozumienia patomechanizmów leżących u podłoża miażdżycy, a co się z tym niewątpliwie wiąże, dalecy jesteśmy od wykrycia w pełni skutecznej terapii. Jedna z hipotez zakłada, że miażdżycy wynika z niedostosowania genomu współczesnego człowieka, który jest bardzo zbliżony do genomu człowieka pierwotnego, do dzisiejszych warunków środowiskowych, głównie stylu życia oraz diety [171, 277, 278]. Na przestrzeni ostatnich 10 tysięcy lat zmieniające się czynniki antropologiczne doprowadziły m.in. do nasilenia odpowiedzi zapalnej, warunkującej i jednocześnie predysponującej ściany naczyń krwionośnych do tworzenia blaszki miażdżycowej. Wyjaśnienie podłoża genetycznego miażdżycy, zarówno, jeśli chodzi o zmiany na poziomie populacyjnym, tj. takie,

w których promowane są korzystne dla człowieka mutacje, jak i te na poziomie indywidualnym, wydaje się być kluczem do pełnego zrozumienia tego procesu [171]. Obecnie badacze analizują profil ekspresji genów regulujących proces powstawania blaszki miażdżycowej na różnych etapach jej rozwoju i badają polimorfizmy genów zaangażowanych w ten proces [118]. Najnowsze wyniki badań ukazują m.in., że niektóre polimorfizmy genów, będące przyczyną osłabienia odpowiedzi zapalnej, wiążą się z wyraźnie zmniejszonym ryzykiem rozwoju miażdżycy [147]. Z drugiej strony, wiadomo dziś, że obok zmian informacji zawartej w DNA, należy badając mechanizmy procesu miażdżycy, uwzględnić zmiany o charakterze epigenetycznym, czyli informacje pozagenowe, które nie dotyczą samej sekwencji, lecz kowalencyjnych modyfikacji DNA i zmian struktury chromatyny. Zaburzenia o charakterze epigenetycznym [17], dzięki którym w identycznych genetycznie komórkach lub organizmach dochodzi do różnego rodzaju ekspresji genów, czego efektem są różnice fenotypowe, coraz częściej uznaje się za jedne z głównych czynników sprzyjających przewlekłym chorobom cywilizacyjnym [15], w tym miażdżycy [302]. Zauważono, że co najmniej kilkanaście kluczowych genów zaangażowanych w proces powstawania i rozwoju miażdżycy [302] jest przynajmniej w części regulowanych przez mechanizmy epigenetyczne, głównie na drodze metylacji DNA.

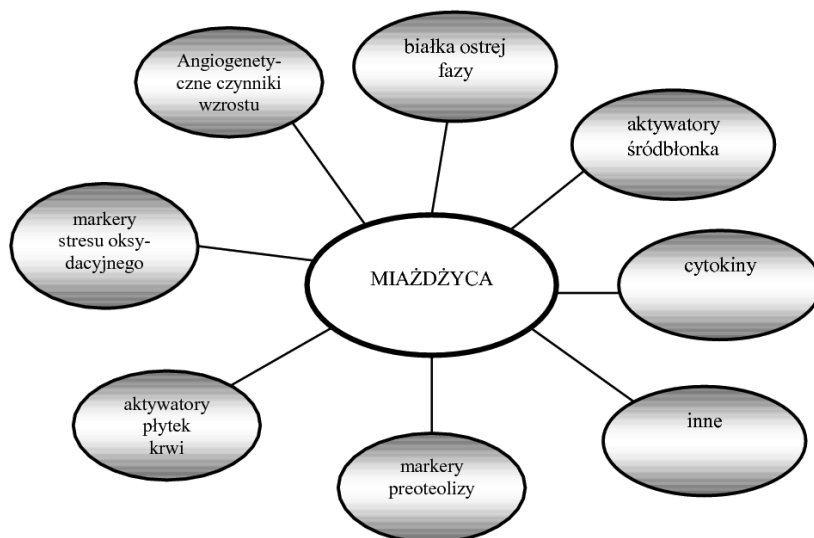
Model uwzględniający nowoczesne koncepcje badawcze, w którym genom, epigenom i czynniki środowiskowe, modulowane poprzez biomarkery i czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego, wpływają na utajoną chorobę sercowo-naczyniową i w sposób pośredni lub bezpośredni na jawną klinicznie chorobę sercowo-naczyniową o podłożu miażdżycowym, został przedstawiony na rycinie 1 [9].

Poszukiwania naukowców w zakresie poznawania patomechanizmów powstawania i rozwoju miażdżycy są dziś przede wszystkim prowadzone dwutorowo. Z jednej strony skupiają się one na wspomnianych analizach profili ekspresji genów, wykrywaniu genetycznych predyspozycji osobniczych, oraz identyfika-



**Rycina 1.** Model koncepcyjny ukazujący sieć zależności pomiędzy genomem, epigenomem, czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego, biomarkerami i czynnikami środowiskowymi a utajoną i jawną klinicznie chorobą sercowo-naczyniową (na podstawie [9]).

cji zaburzeń o charakterze epigenetycznym, z drugiej strony koncentrują się na odkrywaniu nowych czynników ryzyka, badaniu biomarkerów (Rycina 2) [196, 244], analizie czynników środowiskowych oraz na poznawaniu molekularnego podłoża procesu.



Rycina 2. Biomarkery miażdżycy (na podstawie [196]).

W tym drugim podejściu, wielu nowych informacji (danych) dostarcza m.in. proteomika [67, 195, 301], nowoczesna gałąź biologii molekularnej, której celem jest poznanie i scharakteryzowanie wszystkich białek, powstających w wyniku ekspresji ludzkiego genomu. Nazwa proteomika pochodzi od angielskiego określenia „proteom” – *PROTein complement of the genOME*, co oznacza składnik białkowy kodowany przez genom. Celem badań proteomicznych nie jest jedynie otrzymanie listy białek znajdujących się w określonej komórce, lecz poznanie zmian związanych z cyklem życiowym komórki, badanie rozmieszczenia białek w obrębie struktur komórki oraz analiza wzajemnych oddziaływań komórek tworzących tkanki.

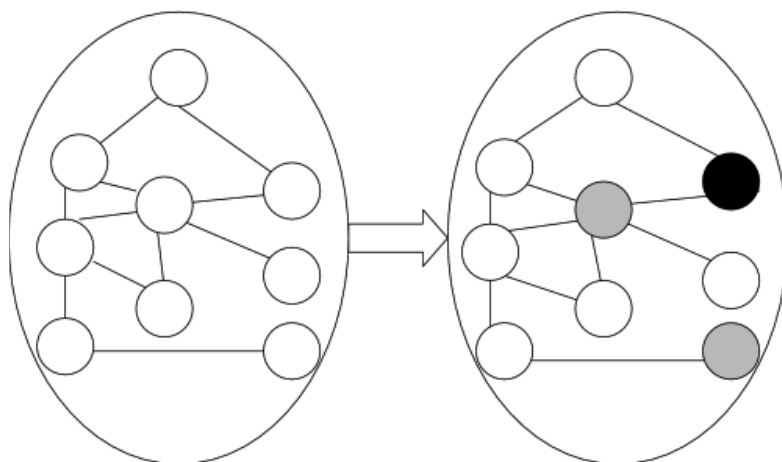
Te dwa wspomniane nurty badawcze, nazywając je bardzo ogólnie „genetyczno-epigenetycznym” i „biomarkerowo-środowiskowym”, wzajemnie się przenikają, a ich wyniki uzupełniają. Badania są prowadzone z wykorzystaniem coraz to bardziej nowoczesnych technologii, których wyjątkowy rozkwit rozpoczął się w drugiej połowie XX wieku i spowodował falę masowych odkryć w dziedzinach biochemii, genetyki i biologii molekularnej. Te liczne odkrycia staną się z pewnością już w niedalekiej przyszłości przyczyną zalewu ogromną ilością informacji. Już dziś ilość danych pochodzących z różnych badań jest olbrzymia i często bywa trudna do ogarnięcia.

Nowe możliwości badawcze łączą się z kolejnymi trudnościami, przed którymi stanęły dziś współczesne nauki biologiczne i medyczne. Przede wszystkim pojawiły się dwie kwestie wymagające pilnego rozwiązania. Pierwszą z nich jest wspomniane pojawienie się dużej ilości danych pochodzących z eksperymentów, co stało się przyczyną problemów wynikających z konieczności ich interpretacji. Druga kwestia wydaje się być o wiele bardziej złożona. Wyniknęła ona z faktu uświadomienia sobie, iż wiele procesów biologicznych, toczących się między innymi w ludzkim organizmie, jest od siebie współzależna i analiza każdego z nich z osobna może prowadzić do formułowania niewłaściwych wniosków.

Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach na gruncie biologii molekularnej i nauk pokrewnych wyraźnie wskazują na to, że organizmy żywe można i właściwie należy traktować jak złożone systemy, których budowa i funkcjonowanie w dużym stopniu określone są przez gęstą sieć oddziaływań zachodzących pomiędzy ich elementarnymi składnikami. Oznacza to m.in., że do niedawna dominujące w naukach biologicznych i medycznych podejście polegające na szczegółowej analizie tych podstawowych składników, choć przyniosło i nadal przynosi wiele bardzo interesujących odkryć, ma też istotne ograniczenia i najprawdopodobniej nie jest wystarczające dla dogłębnego zrozumienia zasad funkcjonowania organizmów żywych, a tym samym wygląda na to, że nie pozwoli w pełni poznać przyczyn powstawania chorób.

Wiele wskazuje na to, że jedną z podstawowych cech obiektów ożywionych jest ich złożoność. Innymi słowy, ich natura wynika ze skomplikowanej struktury oddziaływań pomiędzy składającymi się na nie podstawowymi obiektami i procesami. Oznacza to, że do rzeczywistego zrozumienia budowy i funkcjonowania organizmów żywych niezbędne jest podejście systemowe, polegające na postrzeganiu i badaniu organizmów jako systemów, czyli zbiorów niezależnych, ale połączonych i współpracujących ze sobą elementów [150, 151].

Systemy są czymś więcej niż jedynie sumą elementów składowych. Dzieje się tak dlatego, że system posiada funkcjonalność, która nie jest realizowana przez pojedynczy podsystem ani przez żaden z jego elementów. Mówimy, że takiego systemu nie można uprościć. Aby go zrozumieć, trzeba analizować go jako całość, ponieważ badanie jedynie jego pojedynczych elementów nie pozwoli na uzyskanie dokładnego obrazu takiego systemu. Podejście systemowe jest więc oparte na analizie badanego obiektu jako całości, ze szczególnym zwróceniem uwagi na wszelkie oddziaływania zachodzące w jego wnętrzu i przy jednoczesnym niezaniebawianiu szczegółowej analizy podstawowych elementów, z których się on składa. Na rycinie 3. przedstawiono w sposób schematyczny koncepcję biologii/medycyny systemowej, zgodnie z którą zdrowa komórka charakteryzuje się pewnym stanem sieci powiązań między biomolekułami, a choroba traktowana jest jako zmieniony stan tej sieci [246]. Kolorami szarymi zaznaczono te biomolekuły, których przykładowo stężenie wzrosło, a kolorem czarnym tę cząsteczkę, której stężenie obniżyło się podczas choroby. Celem takiego systemowego podej-



**Rycina 3.** Koncepcja procesu chorobowego (na podstawie [246]) Po stronie lewej znajduje się komórka w stanie zdrowia, a po prawej w stanie choroby, w której dochodzi do wzrostu (kolor szary) oraz obniżenia (kolor czarny) stężenia niektórych biomolekuł.

ścia jest wykrycie sieci zależności pomiędzy molekułami, których zmieniony stan korelowałby z progresją tej choroby.

Obserwowany w ostatnich latach dynamiczny rozwój biologii i medycyny systemowej [45, 97, 185] jest niewątpliwie następstwem pojawienia się wspomnianych nowych możliwości. Z jednej strony wynikają one z tworzenia coraz dokładniejszych modeli zjawisk, wynikającego z postępów na podłożu biologii molekularnej, biochemii i biofizyki, z drugiej strony jest rezultatem coraz lepszych możliwości obliczeniowych współczesnych komputerów i stosowania coraz bardziej wyrafinowanych metod analizy uzyskanych wyników [114, 116]. Podejście systemowe do medycyny może więc okazać się stymulujące dla wielu dziedzin, również takich jak na przykład informatyka czy cybernetyka, które do tej pory w sposób intuicyjny nie były łączone z medycyną.

Potrzeba wykonania analizy zachowania bardzo złożonych układów biologicznych spowoduje prawdopodobnie powstanie nowych narzędzi oraz stanie się przyczyną konieczności zaadoptowania już istniejących, ale takich, których do tej pory do takich badań nie wykorzystywano. Ponadto badania nad nowymi czynnikami, substancjami i cząsteczkami, których istnienie może wynikać z analizy symulacji badanego zjawiska niewątpliwie mogą stać się bodźcem dla rozwoju biologii molekularnej.

Ujęcie systemowe medycyny otwiera przed tą dziedziną, i przed nauką w ogóle, zupełnie nowe możliwości i wyzwania. O tym, że jest to podejście bardzo aktualne, świadczy m.in. nabór wniosków projektowych nt. medycyny systemowej do 7. Programu Ramowego Zdrowie, rozpisanego we wrześniu 2011 roku. Zmierzał on w swych założeniach do stymulowania systemowych podejść biologicznych, które miałyby w przyszłości być wykorzystane do użytku medycznego i klinicznego.

W rozprawie przedstawiono wyniki badań prowadzonych w zakresie poznawania procesu powstawania i rozwoju miażdżycy. Proces ten badano w sposób „tradycyjny” oraz „systemowy”. „Tradycyjne” badania zostały wykonane w grupie chorych w różnych stadiach PChN, dla których punkt odniesienia stanowiła grupa chorych z tradycyjnymi czynnikami ryzyka. Badania te prowadzono w ramach realizacji dwóch projektów, tj. projektu badawczego własnego Ministerstwa Nauki i Informatyzacji pod tytułem: „*Analiza molekularnych podstaw powstawania miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek oraz w niestabilnej chorobie wieńcowej*” (nr grantu N N 402 2098 33) oraz projektu uczelnianego, zatytułowanego „*Ocena zmian zachodzących w śródbłonku naczyń krwionośnych i ich wpływu na powikłania sercowo-naczyniowe u chorych hemodializowanych*” (nr projektu 501-01-2228369-08800 (badania własne)). Z kolei w ramach badań „systemowych” stworzono, w oparciu o sieci Petriego, i następnie przeanalizowano dwa modele wybranych zjawisk biochemicznych zachodzących w trakcie tworzenia blaszki miażdżycowej.

Rozprawa składa się z jedenastu rozdziałów. Rozdział drugi podzielony jest na kilka podrozdziałów. W pierwszym przedstawiono historię ponad 200-letnich zmagania naukowców nad poznaniem patomechanizmów leżących u podłoża procesu. W kolejnym zaprezentowano aktualny stan wiedzy na temat procesu powstawania i rozwoju miażdżycy, ze szczególnym uwzględnieniem zjawisk będących przedmiotem „badań klasycznych” i „systemowych” zaprezentowanych w rozprawie. Rozdział trzeci zawiera opis podstawowych idei biologii i medycyny systemowej. Zaprezentowano w nim wybrane zagadnienia związane z modelowaniem procesów biologicznych za pomocą sieci Petriego. W czwartym rozdziale znajdują się cele pracy, a w piątym charakterystyka populacji badanej oraz metodyka badań laboratoryjnych, proteomicznych, nieinwazyjnych kardiologicznych, systemowych i metodyka analizy statystycznej. W rozdziale szóstym przedstawiono wyniki z podziałem na poszczególne rodzaje badań. Rozdział siódmy rozprawy zawiera omówienie wyników, w rozdziale ósmym znajdują się wnioski, natomiast w rozdziałach dziewiątym i dziesiątym umieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim. W rozdziale jedenastym zaprezentowano piśmiennictwo. Ponadto w rozprawie znajduje się wykaz najważniejszych zastosowanych skrótów



## 2. Klasyczne podejście do badania procesu powstawania i rozwoju miażdżycy

### 2.1. Rys historyczny badań procesu powstawania i rozwoju miażdżycy

Terminu miażdżycy, ang. *atherosclerosis*, użył po raz pierwszy w 1904 roku niemiecki patolog Felix J. Marchand, w celu opisanego zmian degeneracyjnych zaobserwowanych w wewnętrznej ścianie naczyń tętniczych [194]. Natomiast nieco wcześniej, bo w 1834 roku, w książce pt. „*Lehrbuch der pathologischen Anatomie*”, autorstwa Jeana Frèdèrica Lobsteina [184], pojawiło się pojęcie stwardnienie tętnic, ang. *arteriosclerosis*. Etymologia polskiej nazwy nie jest dokładnie znana.

Początek bogatej w wiele przełomowych odkryć historii badań nad procesem powstawania i rozwoju miażdżycy sięga końca XVIII wieku, kiedy to Caleb Hillier Parry, przeprowadzając sekcję zwłok mężczyzny z objawami duszniczy bolesnej w wywiadzie, wykrył zbite i twarde struktury w ścianach jego tętnic wieńcowych i skojarzył ich obecność z objawami, na które uskarżał się zmarły [280]. Pierwszy szczegółowy opis patomorfologiczny zmian miażdżycowych w naczyniach zawdzięczamy Antonio Scarpie (1804 r.) [175, 295]. Z kolei pierwsza koncepcja przyczyn powstawania choroby niedokrwiennej serca, jako następstwa zmian miażdżycowych w naczyniach tętnic wieńcowych, pojawiła się w 1809 roku za sprawą Allana Burnsa [38].

Początkowo postrzegano miażdżycę jako naturalną konsekwencję starzenia się organizmu, choć pojawiały się doniesienia o możliwym udziale innych czynników, takich jak na przykład proces zapalny. O istotnej roli zapalenia po raz pierwszy wspominał w 1815 roku londyński chirurg Joseph Hodgson w książce pt. „*Treatise on the Diseases of Arteries and Vein*” [23, 280, 295]. Było to dość nowatorskie podejście na ówczesne czasy i nie znalazło powszechnego uznania wśród badaczy. Kwestia istotnego udziału procesu zapalnego w rozwoju zmian miażdżycowych została na wiele lat zapomniana i powszechnie dominowało podejście, iż miażdżycy jest w głównej mierze procesem zwyrodnieniowym naczyń.

Wkrótce jednak, za sprawą odkrycia Thomasa J. Vogła, który po raz pierwszy w 1841 roku wykazał obecność cholesterolu w zmianach miażdżycowych [278], pojawiła się nowa koncepcja, która stała się podstawą do powstania teorii lipidowej. Na bezpośredni udział diety bogatocholesterolowej w rozwoju miażdżycy po raz pierwszy zwrócił uwagę w 1908 roku Aleksander Ignatowski. Zaobserwował on zmiany miażdżycowe w naczyniach królika żywionego dietą bogatą

w cholesterol [123]. Z kolei kilka lat później, w 1913 roku, Nikołaj N. Anichkov, uważany za twórcę teorii lipidowej, wraz ze swoim studentem Semenem S. Chatlatovem, wykazał, że podwyższone stężenie cholesterolu może stanowić samodzielny czynnik sprawczy miażdżycy [5, 158]. Teoria lipidowa stała się bardzo popularna i dominowała jeszcze przez cały okres XX wieku. Zaowocowało to serią badań biochemicznych i klinicznych, dzięki którym zidentyfikowano m.in. lipoproteiny o małej gęstości (ang. *low density lipoproteins*, LDL) i dowiedziono ich kluczowego znaczenia dla rozwoju miażdżycy, wykazano udział makrofagów w powstawaniu komórek piankowatych oraz odkryto lipoproteinę a – stanowiącą ogniwo łączące proces miażdżycowy ze stanami prozakrzepowymi [24]. Uzyskane wyniki pozwoliły badaczom wysunąć przypuszczenie, iż skorygowanie hipercholesterolemii może znacząco zmniejszyć zachorowalność i śmiertelność wśród chorych z miażdżycą tętnic wieńcowych [241, 269].

Kolejnymi naukowcami, którzy wnieśli bardzo wiele do badań nad miażdżycą byli czeski lekarz, patolog i polityk Carl von Rokitansky (1804–1878) oraz niemiecki patolog Rudolf von Virchow (1821–1902). Obaj badacze w połowie XIX wieku dostrzegli istotne znaczenie procesu zapalnego w rozwoju zmian miażdżycowych. Należy podkreślić, że Rudolf von Virchow, na podstawie wyników badań histopatologicznych składu blaszek miażdżycowych obecnych w różnych stadiach zaawansowania, stworzył podstawy tzw. teorii infiltracyjnej. Zauważył on m.in., że zmiany miażdżycowe stanowią odpowiedź naczyń na uszkodzenie śródbłonna naczyniowego, w której istotny udział mają proces zapalny, proliferacja komórek, zaburzenia przepływu krwi oraz procesy zakrzepowe. Różnica między wspomnianymi naukowcami polegała na tym, że pierwszy z nich sądził, iż zapalenie jest procesem wtórnym do powstawania zmian miażdżycowych w naczyniach, a drugi podkreślał jego pierwotną rolę w tym procesie [324]. Dziś bliżej jesteśmy przyznania racji niemieckiemu badaczowi [155], aczkolwiek trudno nie zgodzić się z niektórymi koncepcjami von Rokitanskiego.

Nowy wątek w teorii lipidowej pojawił się na początku lat 70. XX wieku, za sprawą Russela Rossa. Wspomniany badacz razem z zespołem wysunął hipotezę, iż miażdżycy rozpoczyna się od lokalnych uszkodzeń śródbłonna naczyniowego i stanowi jego miejscową przewlekłą odpowiedź na lokalny uraz (ang. *response-to-injury hypothesis*) wywołany przez wiele różnorodnych czynników [253, 254, 255, 256]. Stało się to podstawą do stworzenia kolejnej koncepcji, tzw. teorii śródbłonkowej. Russel Ross razem z Johnem Głomsetem kontynuowali badania w tym zakresie, co było o tyle ciekawe, że w tym czasie, a dokładnie w 1976 roku, pojawiły się pierwsze doniesienia o nienaruszonym śródbłonku naczyniowym pokrywającym wczesne zmiany miażdżycowe [56]. Wspomniani badacze szczegółowo scharakteryzowali pojęcie uszkodzenia śródbłonna, jako stanu wywołanego różnymi czynnikami, które zmieniając właściwości bariery śródbłonkowej czynią ją bardziej przepuszczalną dla wielu składników krwi [255]. W ten sposób wyjaśniono tu, jak różne elementy składowe blaszki miażdżycowej gromadzą się

w warstwie podśródbłonkowej naczyń. Początkowo czynnikami, które były brane pod uwagę jako istotne były jedynie zaburzenia w metabolizmie lipidów, później w efekcie wieloletnich badań dołączono do nich kolejne, takie jak czynniki hormonalne czy zwiększone siły ścinania (ang. *shear stress*), charakterystyczne m.in. dla nadciśnienia tętniczego [250].

Następnym milowym krokiem w badaniach nad miażdżycą stanowiły odkrycia Michaela Browna i Josepha Golsteina, którzy stworzyli w latach 70. XX wieku podstawy teorii oksydacyjnej. Najpierw naukowcy ci odkryli receptor dla LDL [34, 35, 91, 92], za co w 1985 roku zostali uhonorowani nagrodą Nobla, a następnie wykazali, że inkubacja natywnych cząsteczek LDL z makrofagami nie prowadzi do powstania kluczowych dla miażdżycy komórek piankowatych, w odróżnieniu od LDL poddanych uprzednio chemicznej acetylacji [34, 35]. W 1989 roku Steinberg wraz ze współpracownikami zaproponował, w oparciu o odkrycia dokonane przez Browna i Goldsteina, hipotezę powstawania miażdżycy, w której główną przyczynę jej powstawania upatrywał w modyfikacji oksydacyjnej LDL [285, 286]. Wskazał on na mechanizmy, dzięki którym utlenione cząsteczki LDL (ang. *oxidized low density lipoproteins*, ox-LDL) mogą wpływać na rozwój miażdżycy. Kolejne wyniki badań uświadomiły badaczom, że już nawet niewielkie modyfikacje LDL mogą inicjować rozwój miażdżycy [25]. Dodatkowo odkryto, że limfocyty T, znajdujące się w blaszkach miażdżycowych, rozpoznają jako antygen ox-LDL [287]. Stało się więc jasne, że w powstawaniu miażdżycy istotną rolę odgrywa układ immunologiczny [110, 135].

Teoria oksydacyjna zaowocowała szeregiem badań klinicznych, w których próbowano wykorzystywać antyoksydanty do hamowania oksydacji LDL i w ten sposób hamować progresję miażdżycy. Pomimo obiecujących wyników płynących z badań *in vitro*, badania prowadzone na ludziach, m.in. CHAOS (*Cambridge Heart Antioxidant Study*), HOPE (*The Heart Outcomes Prevention Evaluation*), SPACE (*the Secondary prevention with Antioxidants of Cardiovascular Disease in End-Stage renal Disease*) i HPS (*The Heart Protection Study*), nie potwierdziły w sposób jednoznaczny skuteczności stosowania antyoksydantów i początkowa euforia odnośnie do kluczowej roli oksydacji w aterogenezie nieco osłabła. Niemniej, pojęcie niekontrolowanego wychwytu ox-LDL, prowadzącego do powstania komórek piankowatych, pozostało jednym z głównych założeń wszystkich teorii powstawania i rozwoju miażdżycy.

W 1966 roku doktor Kilmer McCully wysunął hipotezę o homocysteinowej teorii miażdżycy, według której podwyższone stężenie homocysteiny może przyspieszać powstawanie i progresję miażdżycy [204]. Pierwsze koncepcje tłumaczące to zjawisko wskazywały na dominujące działanie prozakrzepowe, później zauważono działanie cytotoksyczne homocysteiny na śródbłonek naczyńniowy, aż w końcu w latach 90. XX wieku zaproponowano teorię o złożonym mechanizmie wpływu homocysteiny na proces miażdżycy. Według tej ostatniej teorii hiperhomocysteinemia uszkadza śródbłonek w wyniku działania

stresu oksydacyjnego, który jest następstwem wytwarzania natlenku wodoru powstającego pod wpływem utleniania homocysteiny do homocystyny. Z kolei działanie prozakrzepowe homocysteiny jest rozpatrywane jako proces wtórny do uszkodzenia śródbłonka naczyniowego. Dziś wiemy, że w odróżnieniu od innych aminokwasów, homocysteina nie jest wbudowywana do białek, ponieważ brak jest dla niej odpowiedniego kodonu, natomiast może się z nimi łączyć, powodując homocysteinyłację białek, co w konsekwencji zmienia ich strukturę i właściwości biochemiczne, w tym zwiększa podatność na utlenianie. Homocysteinyłowane białka, takie jak albumina, stanowią autoantygeny, które stymulują humoralną odpowiedź immunologiczną. Proces homocysteinyłacji białek uważa się za najbardziej prawdopodobną przyczynę toksyczności homocysteiny. Nie do przecenienia są tu wyniki badań prowadzonych przez profesora Hieronima Jakubowskiego [128, 129, 130], który w 1999 roku dowiódł, że tiolakton homocysteiny będący pochodną homocysteiny jest wytwarzany *in vivo* i jako aktywny tioester może powodować homocysteinyłację białek i m.in. w ten sposób uszkadzać ściany naczyń.

Poza wspomnianymi koncepcjami, które miały niewątpliwy wpływ na nasze dzisiejsze spojrzenie na temat patomechanizmów powstawania i rozwoju miażdżycy, w ponad 200-letniej historii badań pojawiały się i takie projekty, których znaczenie jest do dziś kwestionowane. Według Earl i John Benditt, z początku lat 70. XX wieku, miażdżycy miała być monoklonalnym rozrostem komórek mięśni gładkich naczyń (ang. *smooth muscle cells*, SMCs), wywołanym mutacjami indukowanymi infekcjami wirusowymi lub innymi mutagenami [21]. Teoria ta nie znalazła do dziś dostatecznego potwierdzenia w badaniach eksperymentalnych. Aczkolwiek sam udział czynników infekcyjnych, a wśród nich m.in. bakterii *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* oraz wirusów *Herpes simplex 1 i 2*, *Hepatitis A* czy *Cytomegalovirus*, jako przyczyn uszkodzenia ścian naczyń i rozwoju choroby wieńcowej, jest ciągle przedmiotem wielu współczesnych badań. Rozważane są koncepcje, w których przyjmuje się, że infekcje, szczególnie bakteryjne, mogą współuczestniczyć w tworzeniu miażdżycy poprzez niszczenie śródbłonka naczyń. Dotychczasowe wyniki badań nie są jednak jednoznaczne [47].

Należy w tym miejscu podkreślić, że teorie pojawiające się do początku lat 80. XX wieku uwzględniały przede wszystkim rolę pojedynczych mechanizmów jako przyczyn powstawania zmian miażdżycowych w naczyniach. Istniały zatem obok siebie różne koncepcje, ale nie stanowiły one jednej spójnej teorii. Dodatkowo, jak już wspomniano, przez długi czas w ogóle nie uwzględniano roli procesu zapalnego. Z całą pewnością można dziś stwierdzić, że było to niewłaściwe podejście [132, 133, 189, 181].

W 1993 roku, w artykule opublikowanym w *Nature*, Ross opisał miażdżycę jako następstwo nasilonej zapalno-proliferacyjnej odpowiedzi śródbłonka naczyniowego oraz odpowiedzi komórek mięśni gładkich ściany naczyń na różne

czynniki uszkodzające. Ponadto zwrócił uwagę na złożoność procesu aterogenezy, w który, jak zauważył, zaangażowanych jest wiele czynników wzrostowych, cytokin i cząsteczek regulujących napięcie ściany naczyń [251]. Po kilku latach, w 1999 roku, Ross jako pierwszy oficjalnie ogłosił, że miażdżycę jest przewlekłą chorobą zapalną [252]. Jednoznacznego i niepodważalnego dowodu na wpływ zapalenia na rozwój miażdżycy dostarczyło mu nowe narzędzie badawcze, tj. myszy, u których zastosowano technikę celowania genowego (ang. *gene-targeting*) [35, 70, 134, 297, 298, 297]. W 1992 roku, za ich pomocą, w dwóch niezależnych laboratoriach amerykańskich stworzono linie myszy z wyłączonym genem kodującym apolipoproteinę E (ang. *apo-E-knockout*) [327, 238], a więc takich, u których miażdżycę rozwija się spontanicznie, bez konieczności stosowania diety bogatocholesterolowej. Uzyskanie takich myszy uznano za przełomowe odkrycie w badaniach nad procesem miażdżycy, choć jednocześnie naukowcy zwracali uwagę na fakt, że ich model nie odzwierciedla w sposób wierny ludzkiej miażdżycy i w niektórych aspektach wyraźnie się od niej różni, np. limfocyty T, które są obecne na wszystkich etapach rozwoju miażdżycy u ludzi, u myszy są bardzo słabo reprezentowane [55, 133, 249]. Pomimo pewnych braków, dzięki wspomnianemu modelowi udało się w miejscach rozwoju miażdżycy wykryć nadekspresję naczyniowych cząsteczek przylegania komórkowego typu 1 (ang. *vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1) oraz międzykomórkowych cząsteczek przylegania komórkowego typu 1 (ang. *intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1) [217], nierozzerwalnie związanych z procesem zapalnym. Należy podkreślić, że Ross był współautorem tych badań.

Wyniki wielu współcześnie prowadzonych badań nie pozostawiają wątpliwości, że miażdżycę to przewlekła choroba zapalna [27, 89, 109, 180, 181, 182, 189, 222].

Pod koniec XX wieku stało się dla badaczy oczywiste, że teoria lipidowa oraz teoria śródbłonkowa to dwie koncepcje, które nie konkurują ze sobą, lecz wzajemnie się uzupełniają. W artykule przeglądowym, który w 2002 roku ukazał się w *Nature Medicine*, Daniel Steinberg określił hipercholesterolemię wraz z zapaleniem jako „partners in crime”, czyli współników przestępstwa miażdżycy [285].

## 2.2. Aktualny stan wiedzy na temat wybranych aspektów powstawania i rozwoju miażdżycy

### 2.2.1. Ogólna charakterystyka procesu miażdżycy

Miażdżycę jest dziś postrzegana jako złożony proces zapalno-fibroproliferacyjny toczący się w błonie wewnętrznej dużych i średnich naczyń tętniczych, którego dynamika jest nieustannie modyfikowana przez wiele czynników [142].

Głównym morfologicznym objawem miażdżycy jest pojawienie się komórek piankowatych w błonie wewnętrznej tętnic, natomiast znacznie subtelniejsze zmiany, spowodowane w głównej mierze przez napływ komórek zapalnych i komórek immunokompetentnych oraz miejscowe uwalnianie cytokin i innych mediatorów zapalenia, zachodzą w mikrośrodoisku ściany tętnicy. Obecnie właśnie te zaburzenia są przedmiotem intensywnych badań i źródłem nowych koncepcji [89, 132].

## 2.2.2. Wybrane aspekty patofizjologii dysfunkcji śródbłonna naczyniowego

### A. Ogólny opis zaburzeń związanych z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego

Badacze w większości przypadków są zgodni co do tego, że pierwszym etapem rozwoju miażdżycy jest immunologiczno-zapalna dysfunkcja śródbłonna naczyniowego, będąca sekwencją reakcji pojawiających się w odpowiedzi na uszkodzenie wywołane szeregiem czynników mechanicznych, chemicznych i biologicznych [220]. Do dysfunkcji śródbłonna dochodzi na tle toczącego się lokalnego lub ogólnoustrojowego stanu zapalnego [252].

Kluczowa dla rozpoczęcia reakcji zapalnej jest ekspresja cząsteczki VCAM-1, pod wpływem której następuje przyleganie (adhezja) monocytów i limfocytów T do komórek śródbłonna naczyniowego. Adhezja odbywa się poprzez ligand dla VCAM-1, którym jest bardzo późny antygen 4 (ang. *very late antigen 4*, VLA-4), integryna znajdująca się wyłącznie na powierzchni monocytów i limfocytów [303]. Zakotwiczenie limfocytów T i monocytów do powierzchni śródbłonna, poprzez interakcję VCAM-1 – VLA-4, jest uznawane za początek kaskady wywołującej miażdżycę [277, 278].

Największy udział w rekrutacji monocytów, limfocytów T, a także komórek NK (ang. *natural killer*, NK) do ogniska aktywnego zapalenia [1] ma białko chemotaktyczne monocytów (ang. *monocyte chemotactic protein 1*, MCP-1) i jego C-C chemokinowy receptor typu 2 (ang. *C-C chemokine receptor type 2*, CCR2) [61]. Białko MCP-1 jest syntetyzowane głównie przez monocyty/makrofagi, ale także przez komórki śródbłonna, fibroblasty oraz SMCs. Poza właściwościami chemotaktycznymi, MCP-1 wykazuje zdolność wpływania na odpowiedź immunologiczną typu Th2 [140]. Oprócz MCP-1 kilka innych chemokin również uczestniczy w rekrutacji monocytów, w tym chemokina RANTES (ang. *Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*, RANTES) [105]. Po napływie komórek w okolicę aktywowanego śródbłonna naczyniowego ma miejsce ich transmigracja, czyli przejście ze światła naczynia do warstwy podśródbłonkowej. Proces ten zachodzi pod wpływem chemokin, syntetyzowanych głównie przez komórki śródbłonna naczyniowego i SMCs [182]. Następnie, głównie pod wpływem MCSF, monocyty znajdujące się pod śródbłonkiem różnicują się w kierunku makrofagów.

Istotnym ultrastrukturalnym wykładnikiem zaburzeń, wynikających z opisanej lokalnej aktywacji zapalnej komórek śródbłonka naczyniowego, jest zmiana konfiguracji powierzchni błony od strony światła naczynia, co ma swoje odzwierciedlenie w powstawaniu mikrokosmków, dzięki którym dochodzi do wzmożonego kontaktu elementów morfotycznych krwi ze śródbłonkiem naczyniowym [314]. W następstwie wspomnianych zaburzeń następuje rozszczelnienie złączy międzykomórkowych i powstają kanały, poprzez które mogą przenikać monocyty, limfocyty oraz lipoproteiny. Gromadzenie się tych cząsteczek w warstwie podśródbłonkowej sprzyja dodatkowo adhezji i agregacji płytek krwi, które wydzielając m.in. płytkowy czynnik wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor*, PDGF) oraz inne mitogeny wywołują odpowiedź proliferacyjną SMCs [121, 142].

#### B. Szczegółowy opis zagadnień związanych z dysfunkcją śródbłonka naczyniowego, które zostały wykorzystane do stworzenia modelu opartego na sieciach Petriego

Dzięki badaniom czynnościowym oraz zastosowaniu technik mikroskopowo-elektronowych wiadomo dziś, że śródbłonek naczyniowy odgrywa wiele zasadniczych funkcji w organizmie człowieka [57, 149, 362], wśród których najistotniejsze dotyczą regulacji napięcia ściany naczyń krwionośnych, utrzymania homeostazy pomiędzy procesami krzepnięcia i fibrynolizy oraz regulacji lokalnych procesów zapalnych [58, 173]. Stąd dysfunkcja śródbłonka, w ujęciu ogólnym, związana jest ze zmniejszeniem potencjału wazodylatacyjnego, z wzrostem aktywności prozapalnej i prokrzepowej [64].

Jedną z najistotniejszych cząsteczek regulujących wazodylatacyjne działanie komórek śródbłonka naczyniowego i utrzymującą homeostazę ściany naczyniowej jest tlenek azotu (ang. *nitric oxide*, NO). Odgrywa on w organizmie wiele kluczowych funkcji, które przedstawiono na rycinie 4.

1. Regulacja napięcia naczyniowego.
2. Hamowanie przylegania i agregacji płytek krwi.
3. Modulowanie proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń.
4. Modulowanie apoptozy i proliferacji komórek śródbłonka.
5. Hamowanie przylegania leukocytów do komórek śródbłonka naczyniowego.
6. Modulowanie wewnątrzkomórkowego stanu redox.
7. Hamowanie oddychania komórkowego.

Rycina 4. Podstawowe funkcje tlenu azotu.

NO powstaje z przemiany L-argininy w L-cytrulinę, w reakcji katalizowanej przez syntazy NO (ang. *nitric oxide synthase*, NOS) [122, 281]. Wyróżnia się 3 izoformy NOS, tj. neuronalną (ang. *neuronal nitric oxide synthase*, nNOS), śródbłonkową (ang. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) i indukowalną (ang. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) [212]. Enzymy NOS zbudowane są z dwóch domen połączonych miejscem wiążącym kalmodulinę, tj. N-końcowej domeny oksygenazowej oraz C-końcowej domeny reduktazowej. Transport elektronów przez domenę reduktazową wymaga obecności jonów wapnia i kalmoduliny.

Aby wspomniana reakcja zaszła, potrzebny jest, obok L-argininy, tlen jako substrat oraz kofaktory, takie jak: forma zredukowana fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (ang. *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH), dinukleotyd flawinoadeninowy (ang. *flavin adenine dinucleotide*, FAD), mononukleotyd flawinoadeninowy (ang. *flavin mononucleotide*, FMN) oraz tetrahydrobiopteryna (ang. *tetrahydrobiopterin*, BH<sub>4</sub>) i hem [32, 76].

nNOS i eNOS są enzymami konstytutywnymi, czyli odpowiadają za stałą w warunkach fizjologicznych syntezę NO, zależną przede wszystkim od stężenia jonów wapnia w komórce. Aktywność eNOS zmienia się w zależności od lokalizacji w komórce, fosforylacji oraz wiązania z białkami, w tym m.in. z kaweoliną.

Wiązanie z kaweoliną, regulowane poprzez interakcje wapń-kalmodulina, jest kluczowe dla aktywności eNOS. W niepobudzonej komórce, eNOS jest związana z kaweoliną, co uniemożliwia jej wiązanie z kalmoduliną, i w ten sposób enzym utrzymywany jest w stanie nieaktywnym. Z kolei wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia w odpowiedzi na bodźce, takie jak: wzmożone siły ścinające [125], niedokrwienie/niedotlenienie oraz wpływ agonistów rozszerzających światło naczyń krwionośnych, powoduje w pobudzonej komórce wyparcie kaweoliny z połączenia z kalmoduliną i ponowną aktywację enzymu eNOS [57]. Z kolei izoforma iNOS wykazuje tak silne powinowactwo do związanej z nią kalmoduliny, że pozostaje w pełni aktywna nawet przy najniższych fizjologicznych stężeniach jonów wapnia. Jest ona syntetyzowana dopiero po pobudzeniu m.in. przez cytokiny, niedotlenienie, a także obecność lipopolisacharydu (ang. *lipopolysaccharide*, LPS), a jej aktywność jest niezależna od wzrostu stężenia jonów wapnia w komórce [164]. iNOS generuje NO w ilościach nawet 100–1000-krotnie wyższych niż pozostałe dwie formy NOS [146].

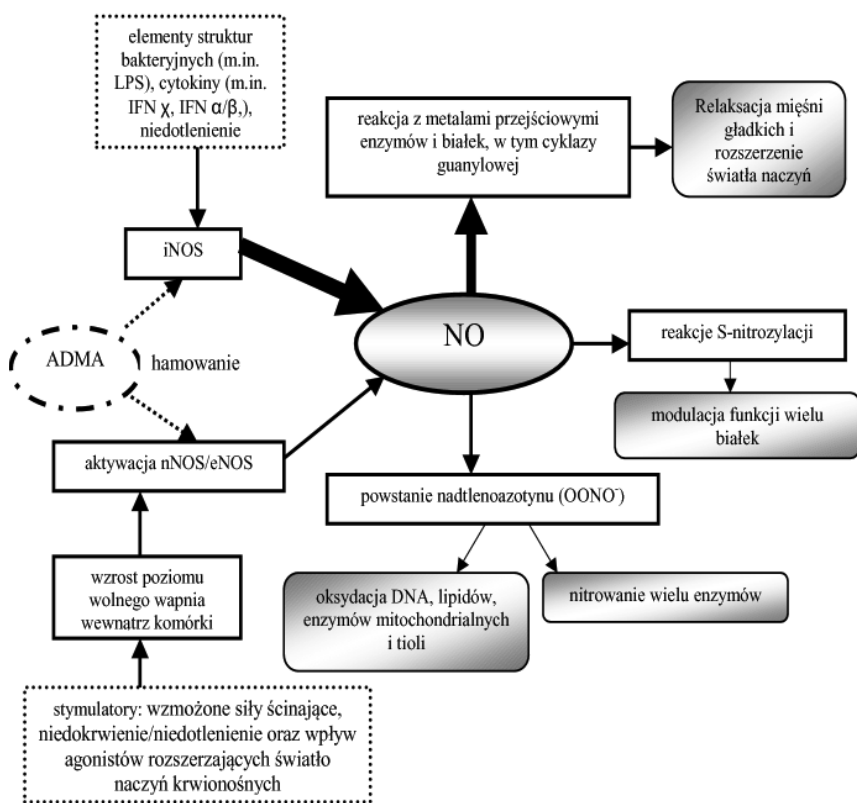
Naturalnym, endogennym, kompetytywnym inhibitorem wszystkich trzech izoform NOS, powstającym w czasie hydrolizy białek lub polipeptydów, głównie histonów [18], zawierających w swym składzie argininę [218], posttranslacyjnie metylowaną przez rodzinę enzymów – metyltransferaz białkowych (ang. *protein methyltransferase*, PRMT) [148], jest asymetryczna dimetylarginina (ang. *asymmetric dimethylarginine*, ADMA) [305, 306]. Metylacja arginin ma duże



znaczenie biologiczne [31] i w przypadku histonów jest jednym z elementów tzw. epigenetycznej regulacji ekspresji genów i wiąże się z modulowaniem dostępności DNA dla białek, które prowadzą transkrypcje i naprawę uszkodzeń DNA [31, 152].

ADMA jest wykrywana w surowicy oraz w wielu narządach, a jej eliminacja z organizmu odbywa się na drodze usuwania z moczem i pod wpływem przemian metabolicznych. Głównym szlakiem metabolicznym jest reakcja katalizowana przez dimetylaminohydrolazę dimetyloarginylową (ang. *dimethylarginine dimethylaminohydrolase*, DDAH) [299], w której ADMA jest przekształcana w L-cytrulinę i dimetyloaminę [64]. Odbywa się to w stanach wzrostu sił ścinających, gdy dochodzi do nasilonej ekspresji czynnika jądrowego  $\kappa B$  zidentyfikowanego w limfocytach B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF- $\kappa B$ ), indukującego transkrypcję licznych genów, w tym genów dla PRMT i DDAH. W organizmie człowieka metylacja białek jest katalizowana przez PRMT, z których kluczowe dla omawianego procesu są PRMT typu 1, 2 i 7 [218]. Podwyższone stężenie w surowicy krwi cholesterolu frakcji LDL, poprzez zwiększanie aktywności PRMT typu 1 oraz zmniejszanie aktywności DDAH, nasila powstawanie i zmniejsza metabolizm ADMA, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia syntezy NO. Ponadto zaobserwowano, że ekspresja PRMT typu 1 w komórkach śródbłonna zwiększa się w odpowiedzi na siły ścinające, a także wskutek działania ROS i ox-LDL [240].

NO oddziałuje na komórki w trojaki sposób [160]. Pierwszy z nich (główny) polega na reakcji z metalami przejściowymi, takimi jak żelazo, miedź i cynk, które występują m.in. w grupach prostetycznych wielu enzymów i białek. W ten sposób NO reguluje aktywność cykazy guanylowej, która przekształca guanozynotrójfosforan (ang. *guanosine triphosphate*, GTP) do cyklicznego guanozynomonofosforanu (ang. *cyclic guanosine monophosphate*, cGMP), co z kolei aktywuje zależną od cGMP fosfatazę. W następstwie tej aktywacji dochodzi do defosforylacji łańcuchów lekkich miozyny, dzięki czemu następuje relaksacja mięśni gładkich i rozszerzenie światła naczyń krwionośnych. Drugi sposób wiąże się z S-nitrozylacją reszt cysteiny, co powoduje zmianę funkcji wielu białek regulatorowych [160]. Z kolei trzeci mechanizm oddziaływania NO na komórki związany jest z bardzo gwałtowną reakcją wiązania z anionorodnikiem ponadtlenkowym, w wyniku której powstaje nadtlenazotyn ( $OONO\cdot$ ) będący głównym mediatorem cytotoxyczności NO [152]. Pod jego wpływem dochodzi m.in. do nitrozytacji oraz nitrowania białek [281], co wiąże się z zahamowaniem aktywności enzymów najbardziej istotnych dla prawidłowego metabolizmu komórki. Powstanie nadtlenoazotynu zmniejsza biodostępność NO, co z kolei zwiększa m.in. ekspresję VCAM-1 na powierzchni komórek śródbłonna i inicjuje reakcję zapalną w ścianie naczynia. Na rycinie 5. przedstawiono w sposób schematyczny zjawiska związane z powstawaniem NO oraz mechanizmy jego oddziaływania na komórki.



Rycina 5. Powstawanie tlenu azotu i mechanizmy jego oddziaływania na komórki.

### 2.2.3. Udział stresu oksydacyjnego w inicjowaniu i rozwoju miażdżycy

#### A. Ogólny opis zaburzeń związanych ze stresem oksydacyjnym

Pojęcie stresu oksydacyjnego używane jest odnośnie do wszelkich procesów zachodzących w ludzkim organizmie, w których dochodzi do wzmożonego wytwarzania reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) przekraczającego wydolność fizjologicznych układów antyoksydacyjnych. Do ROS należą zarówno rodniki tlenowe posiadające niesparowane elektrony na atomie tlenu, np. rodnik wodorotlenowy, jak i te pochodne tlenowe, które niesparowanych elektronów nie mają, np. nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ). W większości przemian biologicznych jako pierwszy wytwarzany jest anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ), którego pojawienie się pociąga za sobą powstawanie następnych ROS, m.in.  $H_2O_2$ , co z kolei prowadzi do nasilonego tworzenia bardziej reaktywnych wolnych rodników, w tym wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego ( $OH^{\cdot}$ ) [262].

Obecnie istnieją dwie koncepcje związane z udziałem stresu oksydacyjnego w patogenezie miażdżycy [290]. W pierwszej z nich, stres oksydacyjny wywoła-

ny licznymi czynnikami sercowo-naczyniowymi stanowi przyczynę miażdżycy i leżących u jej podłoża chorób sercowo-naczyniowych. Druga koncepcja, tzw. hipoteza oksydacyjnej odpowiedzi na zapalenie, zakłada, że czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego przyczyniają się do procesów zapalnych, które z kolei wywołują stres oksydacyjny równolegle do miażdżycy i chorób sercowo-naczyniowych. Pewna modyfikacja wspomnianej drugiej koncepcji zakłada, że pod wpływem procesu zapalnego dochodzi do produkcji wolnych rodników przyczyniających się do remodelingu tkankowego oraz nasilających już istniejący proces zapalny i w konsekwencji wywierających modulujący wpływ na zmiany miażdżycowe [290]. Stres oksydacyjny jest w tym przypadku jedynie w sposób pośredni związany z miażdżycą, a centralne miejsce zajmuje proces zapalny. Pytanie o to, czy wspomniane modyfikacje oksydacyjne LDL są przyczyną czy następstwem miażdżycy pozostaje nadal pytaniem bez jednoznacznej odpowiedzi, choć wiele wyników badań klinicznych i epidemiologicznych wskazuje na fakt, że to ta druga koncepcja może odzwierciedlać rzeczywisty udział stresu oksydacyjnego w patomechanizmie miażdżycy [290]. Zapewne powstałe wątpliwości, po części związane są z niepowodzeniami terapii antyoksydacyjnych. Z drugiej strony wyniki ostatnich badań zdają się rzucać zupełnie nowe światło na nasze dotychczasowe myślenie na temat wolnych rodników i antyoksydantów. Okazuje się bowiem, że wolne rodniki mogą mieć także działanie korzystne na ludzki organizm, np. w niektórych przypadkach mogą być produkowane w odpowiedzi na uszkodzenie komórek i uczestniczyć w przekazywaniu sygnałów pobudzających mechanizmy naprawcze [87].

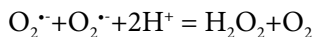
ROS powstają w czasie normalnego oddychania tlenowego i są nieodłącznymi produktami ubocznymi tlenowego metabolizmu. Ponadto, odgrywają one istotną rolę w sygnalizacji komórkowej (tzw. sygnalizacja redoks) oraz są wykorzystywane przez organizm w celach obronnych przed infekcjami. Jednak nadmiar ROS jest zjawiskiem niekorzystnym i prowadzi do licznych uszkodzeń biologicznych struktur komórkowych. Dzieje się tak dlatego, iż w warunkach zaburzonego metabolizmu, niedotlenienia lub niedokrwienia dochodzi do zachwiania równowagi pomiędzy nadmiernym generowaniem ROS a zdolnościami antyoksydacyjnymi organizmu, co skutkuje przesunięciem równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w kierunku procesów utleniania. W przypadku miażdżycy to przesunięcie równowagi odbywa się w kierunku peroksydacji lipidów i białek, będących składnikami aterogennych lipoprotein [154].

*B. Szczegółowy opis zagadnień związanych z udziałem stresu oksydacyjnego w inicjowaniu i rozwoju miażdżycy, które zostały wykorzystane do stworzenia dwóch modeli opartych na sieciach Petriego*

### **Systemy antyoksydacyjne**

Ważną rolę w ochronie organizmu przed rodnikami odgrywają enzymatyczne systemy antyoksydacyjne, wśród których są m.in. dysmutaza ponadtlenkowa

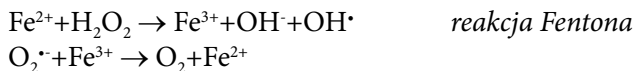
(ang. *superoxide dismutase*, SOD), katalaza, peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa i paraoksonaza (ang. *paraoxonase*, PON) oraz nieenzymatyczne systemy antyoksydacyjne, w tym m.in. witaminy C i E, flawonoidy oraz karotenoidy. SOD jest enzymem, który katalizuje reakcję dysmutacji rodnika ponadtlenkowego [80]:



Powstały w jej wyniku nadtlenek wodoru uczestniczy w tworzeniu wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego (OH•):



w reakcji katalizowanej przez jony metali przejściowych, m.in. jony żelaza [74]:



Aby te reakcje mogły zajść, potrzebne jest wolne żelazo, bo tylko takie jest biologicznie aktywne. Ludzkie organizmy są w naturalny sposób chronione przed oksydacyjnymi uszkodzeniami ze strony wolnego żelaza, poprzez wiązanie go z białkami, takimi jak transferyna czy ferrytyna. Aby nie dochodziło do uszkodzeń wywołanych przez wolne żelazo, wchłanianie oraz magazynowanie żelaza są bardzo precyzyjnie regulowane. W warunkach fizjologicznych, w komórkach znajduje się jedynie niewielka pula wolnego żelaza (ang. *labile iron pool*, LIP) niezbędnego do syntezy enzymów [226]. Dodatkowo zaobserwowano, że anionorodnik ponadtlenkowy zwiększa dostępność wolnego żelaza, ponieważ przyczynia się do jego uwalniania z połączeń z ferrytyną. Wolne żelazo może być następnie wykorzystane do katalizowania reakcji Habera-Weissa, w której powstaje rodnik hydroksylowy odpowiedzialny m.in. za inicjację peroksydacji lipidów zawartych w aterogennych lipoproteinach. Modyfikacje oksydacyjne lipoprotein odbywają się głównie pod wpływem wspomnianych jonów metali przejściowych, tj.  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$ , a także lipooksygenazy syntetyzowanej przez komórki śródbłonka, mieloperoksydazy (ang. *myeloperoxidase*, MPO) wytwarzanej przez aktywowane makrofagi oraz przy udziale reaktywnych formy azotu (ang. *reactive nitrogen species*, RNS), głównie NO [206].

### Modyfikacje oksydacyjne cholesterolu

Na skutek oksydacyjnych modyfikacji, głównie cząsteczek LDL, powstają tzw. minimalnie zmodyfikowane cząsteczki LDL (ang. *minimal modified low density lipoproteins*, mm-LDL). Zjawisko to jest najczęściej inicjowane peroksydacją lipidów, podczas której dochodzi do degradacji wielonienasyconych kwasów tłuszcz-

czowych, wzrostu formowania nadtlenków lipidowych triglicerydowych i fosfolipidowych (poza sfingolipidami [278]) z CE, i ich rozpadu do aldehydów, np. dialdehydu malonowego czy 4-hydroksynonenalu.

Do modyfikacji tych dochodzi pomimo, iż komórki organizmów tlenowych wyposażone są we wspomniane systemy antyoksydacyjne [102]. Mm-LDL z powodu silniejszego wiązania przez proteoglikany macierzy zewnątrzkomórkowej zostają niejako odizolowane od antyoksydantów. Oksydowane fosfolipidy w mm-LDL uważa się za główne czynniki prozapalne wywołujące przewlekły stan zapalny w miażdżycy [176]. Z drugiej strony zauważono, że zwiększają one ekspresję enzymów ochronnych, takich jak np. oksygenaza hemowa (ang. *heme oxygenase*, HO-1), która jest zaangażowana w kontrolę reakcji zapalnych, m.in. poprzez wpływ na tempo katabolizmu hemu [126].

Mm-LDL, podobnie jak natywne LDL, są rozpoznawane przez komórkowy receptor apolipoproteina B/apolipoproteina E (ang. *apolipoprotein B*, apoB)/(ang. *apolipoprotein E*, apoE) i dzięki temu nadal uczestniczą w fizjologicznym obiegu cholesterolu [82, 126, 230, 231]. Jednak już nawet ta minimalna modyfikacja powoduje, że mm-LDL stają się rozpoznawalne dla komórek immunokompetentnych. Ich pojawienie się stymuluje ekspresję receptorów podobnych do białka Toll (ang. *Toll-like receptor*, TLR) na powierzchni komórek prezentujących antygen – głównie komórek dendrytycznych, makrofagów, limfocytów B oraz limfocytów T regulatorowych. W miażdżycy szczególnie istotną rolę odgrywają TLR typu 4 (ang. *Toll-like receptor type 4*, TLR4) [10, 321], które w połączeniu ze szpikowym białkiem różnicowania 2 (ang. *myeloid differentiation-2*, MD-2) i antygenem zróżnicowania CD-14 rozpoznają mm-LDL, ale także ox-LDL, lipopolisacharydy (ang. *lipopolysaccharide*, LPS) oraz białka szoku cieplnego (ang. *heat shock protein*, HSP), w tym 60-KDa HSP (ang. *60-kDa heat shock protein*, HSP60).

W następstwie połączenia TLR4 z ligandem dochodzi do wydzielania licznych substancji, wśród których są m.in. czynnik stymulujący kolonię makrofagów (ang. *macrophage colony stimulating factor*, MCSF), MCP-1 oraz czynnik tkankowy (ang. *tissue factor*, TF). Rola TLR4 nie ogranicza się więc jedynie do wychwytywania zmodyfikowanych lipoprotein i udziału w powstawaniu komórek piankowatych, lecz także dotyczy wpływu na lokalny napływ monocytów, ich transmigrację, a następnie transformację w kierunku makrofagów, wywołania odpowiedzi zapalnej, a także degradacji macierzy [103].

Ponadto, pod wpływem mm LDL dochodzi do zahamowania fagocytozy ciał apoptotycznych (proces aktywno-zależny) przez makrofagi oraz do makrofagowego zwiększenia wychwyty utlenionych lipoprotein LDL (ang. *oxidized low density lipoproteins*, ox-LDL) (szlak niezależny od aktywny). Efektywna fagocytoza ciał apoptotycznych, czyli obumarłych komórek piankowatych, jest zjawiskiem pożądanym, ponieważ zapobiega uwalnianiu się z nich toksycznych dla komórek składników sprzyjających zapaleniu, niestabilności blaszki miażdżycowej oraz tworzeniu zakrzepu [208].

W następstwie tych zmian nasila się lokalny stres oksydacyjny, któremu nie jest w stanie przeciwdziałać ani obecność enzymów antyoksydacyjnych, ani naturalne antyoksydanty.

Dalsza modyfikacja oksydacyjna aterogennych lipoprotein obejmuje ich składnik białkowy, tj. apoB-100, który w mm-LDL nie wykazywał aktywności biologicznej [176]. W następstwie pojawienia się produktów rozpadu CE, tj. aktywnych aldehydów, takich jak np. malonyldialdehyd i 4-hydroksynonenal, będących pierwszymi produktami oksydacji lipidów w lipoproteinach, dochodzi do ich łączenia z dodatnio naładowanymi grupami e-aminowymi lizyny cząsteczki apoB-100 [36, 206]. Powoduje to fragmentację białka oraz zamianę jego ładunku elektrycznego z dodatniego na neutralny, a następnie hamowanie komórkowej degradacji tej frakcji przez fizjologiczny receptor. W ten sposób powstają ox-LDL [284]. Obok peroksydacji, lipoproteiny, zatrzymane podśródbłonkowo, w wyniku dysfunkcji śródbłonka naczyniowego, ulegają także modyfikacjom polegającym na agregacji [290]. Procesami, które stymulują agregację mogą być utlenianie, lipoliza oraz hydroliza zawartej w LDL sfingomieliny do ceramidów. Hydroliza odbywa się pod wpływem sfingomielinazy uwalnianej przez makrofagi i komórki śródbłonka. Zauważono, że makrofagi wychwytyują zagregowane LDL znacznie łatwiej niż postaci natywne [277].

Powstałe ox-LDL przestają być dalej rozpoznawane i degradowane poprzez fizjologiczny receptor apo B/E i zaczynają być aktywnie pobierane przede wszystkim dzięki zwiększonemu powinowactwu do receptorów zmiatających (ang. *scavenger receptor*, SR) znajdujących się na powierzchni komórek jednojądrzastych, głównie monocytów i makrofagów [62]. Komórki te napływają do warstwy podśródbłonkowej w następstwie lokalnego zapalenia [98]. Poza cholesterolem zawartym w cząsteczkach LDL, źródłem cholesterolu w makrofagach, i to głównie zestryfikowanego, są również lipoproteiny resztkowe (tzw. remnanty), pochodzące z CM oraz lipoprotein o bardzo małej gęstości (ang. *very low density lipoproteins*, VLDL), a także lipoproteina (a), której część białkowa (glikoproteina a) kowalentnie wiąże się z apoB-100 cząsteczki LDL. Lipoproteiny resztkowe, podobnie jak cząsteczki LDL, mogą podlegać utlenianiu lub agregacji i tak zmodyfikowane są internalizowane przez makrofagi. Bardzo ważną rolę w zakresie wiązania ox-LDL przypisuje się TLR, podobnie jak to było w przypadku mm-LDL [84, 288].

Początkowo, wychwyt ox-LDL jest zjawiskiem korzystnym, gdyż ogranicza szkodliwy wpływ zmodyfikowanych lipoprotein na komórki śródbłonka i SMCs. Jednak wkrótce, pod wpływem ox-LDL, które uszkadzają enzymy w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym i zwiększają ilość ROS generowanych przez komórki śródbłonka naczyniowego, SMCs i makrofagi, [257] dochodzi do nasilenia zjawiska stresu oksydacyjnego. Napływające ox-LDL powodują wzrost cyklicznego adenylozynomonofosforanu (ang. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) w komórkach śródbłonka naczyniowego, co przyczynia się m.in. do nasilenia syntezy MCP-1, MCSF oraz szeregu komórkowych molekuł adhezyjnych, w tym

VCAM-1, płytkowo-śródłonkowej cząsteczki adhezyjnej 1 (ang. *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, PECAM-1), ICAM-1 oraz selektyn P i E. Poza wychwytem zmodyfikowanych lipoprotein, receptory zmiatające odgrywają wiele bardzo istotnych funkcji w procesie rozwoju blaszki miażdżycowej. Niektóre z nich, tj. receptory podobne do lektyny typu 1 wiążące utlenione LDL (ang. *lectin-like oxidized LDL receptor-1*, LOX-1) przyczyniają się do dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, biorą udział w zapaleniu i proliferacji SMCs, czyli właściwie uczestniczą w procesie tworzenia blaszki miażdżycowej [94].

Wychwyty zmodyfikowanych cząsteczek nie podlega regulacji zależnej od stężenia cholesterolu, co prowadzi do nieograniczonej absorpcji cholesterolu przez makrofagi i w konsekwencji dochodzi do ich przeładowania cholesterollem. Makrofagi zaczynają tracić swoją mobilność i stają się integralną częścią ściany naczynia, ulegając transformacji do komórek piankowatych zawierających w cytoplazmie charakterystyczne złogi CE. Stanowią one podstawę do powstania nacieczenia tłuszczowego w ścianie naczyń, czyli początkowego stadium rozwojowego miażdżycy. Makrofagi i powstałe z nich komórki piankowe produkują ROS i metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *matrix metalloproteinases*, MMPs), a także czynnik tkankowy inicjujący krzepnięcie. Ponadto, obecność komórek piankowatych sprzyja aktywowaniu fagocytów, głównie makrofagów, przyczynia się do aktywacji oksydazy NADPH, co prowadzi do nasilenia stresu oksydacyjnego. Oksydaza NADPH katalizuje bowiem transfer elektronów z NADPH na tlen prowadząc przy tym do powstania anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru. Enzym ten zbudowany jest z licznych podjednostek i w niepobudzonych fagocytach część z tych podjednostek rozlokowana jest w cytoplazmie, część natomiast zakotwiczona jest w błonie komórkowej. Aktywacja komórki żernej powoduje migrację podjednostek cytozolowych oraz ich asocjacje ze składowymi błonowymi. Proces ten przyczynia się do powstania czynnej postaci enzymu.

Ostatecznie komórki piankowe w obrębie uszkodzenia miażdżycowego obumierają, tworząc tzw. ciała apoptotyczne, a komórkowe zasoby CE i wolnego cholesterolu zostają uwolnione do środowiska. Proces ten uczestniczy w powstawaniu lipidowego lub martwiczego rdzenia zaawansowanej blaszki miażdżycowej [277, 293].

Duża koncentracja komórek zapalnych doprowadza do pogłębienia się zjawiska stresu oksydacyjnego. Dodatkowo, ciągłe uwalnianie ROS nasila proliferację makrofagów, stymuluje wytwarzanie kolagenu w fibroblastach, prowadzi do proliferacji i migracji SMCs [43] oraz do aktywacji płytek krwi. ROS przyczyniają się także do zmniejszonej biodostępności NO [49], stale syntetyzowanego w komórkach śródbłonna naczyniowego przez eNOS. Jedną z przyczyn tej zmniejszonej biodostępności może być reakcja anionorodnika ponadtlenkowego z NO. Reakcja ta przebiega trzykrotnie szybciej niż konkurująca z nią reakcja dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego katalizowana przez SOD [276]. Inaktywacja NO odbywająca się prawdopodobnie za pośrednictwem receptora LOX-1 [49]

przyczynia się do istotnego zmniejszenia aktywności eNOS [309]. Ma to ważne znaczenie dla rozwoju miażdżycy, ponieważ eNOS wykazuje wiele właściwości anty-aterogennych, m.in. zapobiega aktywacji śródbłonna naczyniowego, agregacji płytek krwi, proliferacji SMCs oraz adhezji leukocytów.

Lokalny stres oksydacyjny jest istotnym elementem patogenetycznym miażdżycy. Z jednej strony jest on przyczyną wspomnianej zwiększonej peroksydacji lipidów i źródłem powstawania nadtlenków [268], z drugiej strony przyczynia się do zwiększonej ekspresji czynnika NFκB oraz receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów gamma (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPARγ [219]). Istnieje coraz więcej dowodów na to, że receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (ang. *peroxisome proliferator activated receptors*, PPARs) pełnią istotną rolę w kształtowaniu odpowiedzi immunologicznej, głównie w przebiegu reakcji zapalnej. W konsekwencji tych zmian dochodzi do pogłębienia stanu zapalnego i wzrostu syntezy cytokin.

#### 2.2.4. Udział procesów zapalnych i immunologicznych w inicjowaniu i rozwoju miażdżycy

##### *Procesy zapalne i immunologiczne*

W ostatniej dekadzie stało się jasne, że naturalna odporność, której mechanizmy są uruchamiane natychmiast po kontakcie z patogenem, nie jest jedynie połączeniem niespecyficznych odpowiedzi oraz zjawiska fagocytozy, lecz odgrywa rolę pierwszych skrzywiec w bardzo precyzyjnym rozpoznawaniu mikroorganizmów patogennych o konserwowanej ewolucyjnie budowie (ang. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Niektórzy badacze sugerują, że być może same produkty oksydacji lipidów sprzyjają przekształceniu się ostrej odpowiedzi zapalnej w stan przewlekły [176].

Staje się więc dla badaczy coraz bardziej oczywiste, że układ odpornościowy człowieka odgrywa ważną, o ile nie centralną, rolę w procesie powstawania i rozwoju miażdżycy. Zgodnie z immunologiczną koncepcją, zaproponowaną przez Wicka i wsp. w latach 90. ubiegłego wieku [320, 322, 323], to właśnie elementy komórkowe i humoralne układu odpornościowego są kluczowe dla aterogenezy. Zauważono, że już na bardzo wczesnych etapach miażdżycy u osób bezobjawowych, u których we wczesnych zmianach znajdujących się w miejscach znanych z predyspozycji do tworzenia się w późniejszym okresie blaszek miażdżycowych, jako pierwsze pojawiają się komórki limfoidalne, a dopiero po nich makrofagi i SMCs [327]. Miałoby to świadczyć o tym, że ani makrofagi, ani tym bardziej powstające z nich na późniejszym etapie komórki piankowate, nie odgrywają kluczowej roli w procesie inicjowania i rozwoju blaszki miażdżycowej, lecz właśnie komórki limfoidalne, wśród których przeważają limfocyty T pomocnicze (ang. *T-helper cells*, Th) [209]. Wiadomo, że aby doszło do uruchomienia odpowiedzi



immunologicznej, zwabione chemotaktycznie dziewicze limfocyty T (w miażdżycy są to głównie limfocyty T CD4+) muszą najpierw ulec aktywacji. Początkowo ma miejsce prezentacja antygeny, którym w przypadku miażdżycy może być fragment „strawionej” cząsteczki ox-LDL, ale także HSP60 lub fragmenty antygenów bakteryjnych [108, 111, 132]. Do tej prezentacji dochodzi w wyniku bezpośredniego kontaktu receptora komórek T (ang. *T cell receptor*, TCR), znajdującego się na dziewiczych limfocytach T, z białkami głównego układu zgodności tkankowej klasy II (ang. *major histocompatibility complex class II*, MHC II) obecnymi na powierzchni komórek prezentujących antygen. Najczęściej tymi komórkami są komórki dendrytyczne lub rzadziej makrofagi. W odróżnieniu od komórek dendrytycznych, komórki linii monocytarno-makrofagowej syntetyzują białka MHC II dopiero po pobudzeniu, np. interferonem gamma (ang. *interferon-gamma*, IFN- $\gamma$ ). Warunkiem niezbędnym do zapoczątkowania aktywacji dziewiczego limfocytu T jest pojawienie się co najmniej dwóch sygnałów od komórek prezentujących antygen. Pierwszym z nich jest wspomniany kontakt TCR-MHCII, a drugim kostymulacja, w której kluczowe jest oddziaływanie między antygenem CD28 na limfocytach T oraz antygenami CD80/CD86 na komórce dendrytycznej. Wykazano, że oddziaływanie między CD28 a CD80 promuje odpowiedź immunologiczną typu komórkowego (Th1), natomiast reakcja z CD86 – odpowiedź typu humoralnego (Th2) [134, 168].

Podczas procesu aktywacji, limfocyt T wchodzi w interakcję z komórką prezentującą antygen na drodze pośredniego i bezpośredniego kontaktu. Pośredni kontakt ma miejsce dzięki produkowanym cytokinom, w tym m.in. ligandom receptora aktywującego czynnik jądrowy  $\kappa$ B zidentyfikowany w limfocytach B (ang. *receptor activator of nuclear factor NF- $\kappa$ B ligand*, RANKL), które łącząc się z receptorem aktywującym jądrowy czynnik NF- $\kappa$ B (ang. *receptor activator of nuclear factor NF- $\kappa$ B*, RANK), znajdującym się na komórce prezentującej antygen, stymulują wydzielanie licznych cytokin o szerokim spektrum działania, w tym interleukiny 1, 6 i 12 (ang. *interleukin 1, 6, 12*, odpowiednio: IL-1, IL-6 IL-12) mających kluczowe znaczenie dla procesu zapalnego. Z kolei bezpośredni kontakt limfocytu T z komórką prezentującą antygen odbywa się poprzez interakcję między cząsteczką CD40, pełniącą funkcje receptora na powierzchni komórek prezentujących antygen, a jej ligandem (ang. *cluster of differentiation 40 ligand*, CD40L) na powierzchni pobudzonych limfocytów T [235]. W wyniku tego oddziaływania dochodzi do nasilonej sekrecji IL-1, czynnika martwicy nowotworów alfa (ang. *tumor necrosis factor-alpha*, TNF- $\alpha$ ) i beta (ang. *tumor necrosis factor-beta*, TNF- $\beta$ ), chemokin, IFN- $\gamma$  oraz IL-12 [16, 319].

Cechą charakterystyczną pobudzonych limfocytów jest wydzielanie licznych cytokin, które pełnią funkcję regulacyjną i ukierunkowują odpowiedź immunologiczną tak, aby była możliwa eliminacja antygeny, który ją wywołał. Jeżeli obecność antygeny w organizmie wydłuża się, dochodzi do różnicowania pobudzonych limfocytów w kierunku komórek Th1 lub Th2. Czynnikiem, które doprowa-

dzają do powstania limfocytów Th1 są głównie IFN- $\gamma$  oraz IL-12. Synergistycznie z IL-12 działa interleukina 18 (ang. *interleukin 18*, IL-18) wydzielana przez komórki prezentujące antygen. Pobudza ona limfocyty Th1 do wytwarzania IFN- $\gamma$ . IL-18 uważana za czynnik prozapalny, poza indukcją IFN- $\gamma$ , stymuluje wydzielanie IL-6, interleukiny 8 (ang. *interleukin 8*, IL-8), zwiększa ekspresje adhezyjnych molekuł oraz aktywność metaloproteinaz, co w konsekwencji destabilizuje już istniejącą blaszkę miażdżycową. Zaobserwowano, że eliminacja zaangażowanego w obronę przeciwwirusową IFN- $\gamma$  zmniejsza miażdżycę o 60% [104], natomiast eliminacja IL-18 zmniejsza ją o 35% [68, 132, 296].

Istnienie odpowiedzi immunologicznej typu Th1 w procesie miażdżycy zostało potwierdzone na przykładzie chorób układu sercowo-naczyniowego, gdzie zaobserwowano znacznie zwiększone stężenie neopteryny, wytwarzanej przez monocyty/makrofagi pobudzone za pośrednictwem IFN- $\gamma$ . Wiadomo, że IFN- $\gamma$  jest jedynym bezpośrednim mediatorem produkcji tego białka i przypuszcza się, że poziom jego syntezy wpływa na regulację aktywności monocytów/makrofagów pobudzanych przez IFN- $\gamma$  [325].

Wspomniana interakcja CD40-CD40L może mieć kluczowe znaczenie nie tylko dla promowania odpowiedzi Th1 w miażdżycy, ale także odpowiedzi Th2. Na komórkach dendrytycznych, w następstwie tej interakcji, dochodzi do zwiększonej ekspresji antygenów MHC, cząsteczek kosymulujących oraz cząsteczki OX40L, poprzez którą zostaje przekazany sygnał dziewiczym limfocytom T do wytwarzania interleukiny 4 (ang. *interleukin 4*, IL-4) [16] kierującej ich różnicowanie w kierunku limfocytów Th2. Różnicowanie odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1 lub Th2 zależy od rodzaju i ilości antygeny, stopnia aktywacji i dojrzałości komórek immunokompetentnych, drogi przekazywania sygnału oraz cytokin [319]. W przypadku procesu miażdżycy ma to kluczowe znaczenie, ponieważ odpowiedź typu Th1 wraz z wydzielanymi przez limfocyty Th1 cytokinami, głównie IL-2, TNF- $\alpha$  i - $\beta$ , IFN- $\gamma$ , oraz interleukiną 3 (ang. *interleukin-3*, IL-3) ma charakter pro-aterogenny, natomiast odpowiedź typu Th2 wraz z wytwarzanymi IL-4, interleukiną 5 (ang. *interleukin 5*, IL-5), interleukiną 10 (ang. *interleukin 10*, IL-10) oraz IL-13 (ang. *interleukin 13*, IL-13) hamuje rozwój miażdżycy [55]. Cytokiny profilów Th1 i Th2 wzajemnie na siebie oddziałują. Przeprowadzone doświadczenia na myszach *apo-E-knockout* wskazują na dominację odpowiedzi typu Th1 w blaszkach miażdżycowych, z drugiej strony cytokiny profilu Th2 też mogą brać udział w rozwoju miażdżycy, choć istnienie tego zjawiska zaobserwowano jedynie w warunkach hipercholesterolemii [174]. Jednym z wyjaśnień tego dość niespodziewanego przestrojenia z Th1 na Th2 może być wpływ niektórych metabolitów ox-LDL, które hamując produkcję IL-12 oraz IFN- $\gamma$  stymulują jednocześnie syntezę IL-4 i IL-10 [20]. Obecność Th2 z jednoczesnym obniżeniem lub nawet brakiem Th1 zaobserwowano w ścianach tętniaków aorty brzusznej u ludzi [271]. Wygląda na to, że należy zweryfikować nasze podejście do udziału odpowiedzi Th1 i Th2 w patomechanizmach miażdżycy, tym bardziej,

że dotychczasowe próby ukierunkowania profilu Th1 na profil Th2 w miażdżycy niekoniecznie przyczyniały się do redukcji zmian miażdżycowych [109].

Limfocyty T wydają się być kluczowe dla zapoczątkowania miażdżycy, podczas gdy limfocytom B, których aktywacja i proliferacja może odbywać się pod wpływem komórek dendrytycznych oraz za pośrednictwem cząsteczki CD40 na aktywowanych limfocytach Th, przypisuje się znaczenie w nasilaniu procesu i podtrzymywaniu jego trwania [100, 101]. Gromadzące się w błonie wewnętrznej limfocyty T [210] razem z komórkami piankowatymi tworzą nacieczenia tłuszczowe. Obok efektorowych limfocytów T i makrofagów, ogniska miażdżycowe zawierają także mastocyty, które dzięki wytwarzanym proteazom wpływają na degradację macierzy komórkowej i modyfikują lokalne odkładanie lipoprotein [153]. Zauważono, że dopiero w zaawansowanych zmianach miażdżycowych makrofagi wraz z SMCs uzyskują liczebną przewagę nad populacją limfocytów T.

### *Koncepcja autoimmunologiczna*

Choć nie wszyscy badacze są dziś przekonani co do pierwotnej roli jaką miałyby odgrywać procesy immunologiczne w patogenezie miażdżycy, to generalnie koncepcja, w której układ odpornościowy bierze udział w procesach leżących u podłoża miażdżycy ma dziś w nauce ugruntowaną pozycję [20, 108, 110, 207, 239, 329]. Z drugiej strony pojawiają się doniesienia, w których badacze, poza uznawaniem kluczowej roli układu immunologicznego w procesie powstawania i rozwoju miażdżycy, proponują, aby postrzegać miażdżycę w aspekcie choroby autoimmunologicznej. Na poparcie swoich przekonań podkreślają fakt istnienia szeregu podobieństw pomiędzy miażdżycą a innymi chorobami autoimmunologicznymi, np. reumatoidalnym zapaleniem stawów [73, 275]. Rolę najważniejszych autoantygenów w przypadku miażdżycy miałyby pełnić ox-LDL oraz białka szoku cieplnego (ang. *heat shock proteins*, HSP).

Koncepcja autoimmunologicznych uwarunkowań miażdżycy znajduje swoje potwierdzenie w wynikach licznych badań prowadzonych w ostatnich latach. Wykazano, że pod wpływem ox-LDL dochodzi do aktywacji limfocytów T, odpowiedzi komórkowej oraz wytwarzania przeciwciał anty – ox-LDL, które przypominają przeciwciała antyfosfolipidowe. Potwierdza to tezę o autoagresyjnej stymulacji układu odpornościowego przez ox-LDL. Z kolei HSP, powszechnie nazywane „białkami stresu” lub chaperonami, czyli białkami opiekuńczymi w stosunku do pozostałych wewnątrzkomórkowych białek, ze względu na swoje właściwości, też pasują do koncepcji o autoantygenach. Dziś wiemy, że HSP pełnią dwojaką funkcję, w zależności od tego, czy znajdują się wewnątrz, czy na zewnątrz komórki. Gdy HSP znajdują się wewnątrz komórek, chronią pozostałe białka przed proteolizą indukowaną różnymi czynnikami stresowymi, takimi jak wysoka temperatura, niedotlenienie, infekcje, stresse mechaniczne czy chemiczne oraz wolne rodniki. Z drugiej strony, HSP mają także swój istotny udział w takich procesach, jak apoptoza, nowotworzenie oraz w przebiegu stanów zapalnych, gdy na skutek aktywne-

go transportu [59] lub w wyniku rozpadu komórki znajdują się na zewnątrz komórki [216]. Wydaje się, że taka zewnątrzkomórkowa lokalizacja może stać się przyczyną aktywacji prozapalnych mechanizmów immunologicznych w organizmie.

Z uwagi na duży konserwatyzm struktury HSP istnieje możliwość zachodzenia immunologicznych reakcji krzyżowych między obcogatunkowymi HSP, m.in. 65-KDa mykobakteryjnym HSP (ang. 65-KDa HSP, HSP65), chlamydiovym HSP60 oraz HSP60 u *Escherichia coli* a ich ludzkimi homologami. Z jednej strony ta wysoka homologia strukturalna pomiędzy autologicznym HSP a wspomnianymi obcogatunkowymi HSP może przyczynić się do tolerancji immunologicznej. Z drugiej strony może ona wywołać odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko determinantom antygenowym występującym zarówno u człowieka, jak i u patogenu [3], co z kolei może doprowadzić do tkankowo-specyficznej odpowiedzi immunologicznej. W następstwie tej odpowiedzi może zostać wywołana reakcja autoimmunologiczna, która, poprzez własne mechanizmy efektorowe gospodarza, może doprowadzić do zniszczenia komórek i tkanek [170]. Koncepcja autoimmunologicznego podłoża powstawania i rozwoju miażdżycy, w której ludzkie HSP60 odgrywałoby centralną rolę, jest jedną z najbardziej intensywnie badanych w ostatnich latach [100]. Poza opisaną mimikrą antygenową postulowane są inne mechanizmy, które tłumaczyłyby to ważne miejsce, jakie w tej koncepcji zajmuje ludzkie HSP60. Rozważa się m.in. możliwość zachodzenia modyfikacji (np. oksydacji) autogennych HSP. Niektórzy naukowcy twierdzą, że obecność zmodyfikowanego biochemicznie białka HSP60, produkowanego i uwalnianego przez komórki śródbłonka naczyniowego w warunkach stresu może mieć kluczowe znaczenie dla rozwoju miażdżycy. Poza tym część badaczy uważa, że HSP mogą działać jak sygnały ostrzegawcze informujące o uszkodzeniach komórek. Tzw. „model niebezpieczeństwa” zaproponowany przez Polly Matzinger [200, 201, 202] zakłada, że sygnałem, który stymuluje odpowiedź immunologiczną w organizmie człowieka jest nie sama obecność patogenu/antygeny i rozpoznawanie go jako obcego, lecz uszkodzenia, jakie wywołał [216]. Zgodnie z tym modelem układ odpornościowy jest pobudzany przez sygnały alarmowe, które dochodzą do niego z uszkodzonych tkanek, a nie poprzez odpowiedź na reakcję „własne-obce”. Według Matzinger, czynnikami pełniącymi rolę sygnałów ostrzegawczych w ludzkim organizmie są cząsteczki o budowie konserwatywnej, położone w warunkach fizjologicznych wewnątrz komórki, które jeśli na skutek stresu, zakażenia lub martwicy pojawią się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej spowodują uszkodzenia komórek [216]. HSP wydają się być właśnie takimi cząsteczkami. Zauważono, że w warunkach fizjologicznych HSP60 nie ulegają ekspresji na powierzchni komórek śródbłonka naczyniowego. Natomiast, gdy na śródbłonek oddziałują czynniki określane mianem śródbłonkowych stresorów, takie jak np.: infekcja *Chlamydia pneumoniae*, palenie papierosów, stres mechaniczny (nadciśnienie tętnicze), ROS, infekcje bakteriami Gram ujemnymi (obecność LPS), ox-LDL, niektóre leki, produkty zaawansowanej glikacji białek

(ang. *advanced glycation end products*, AGE), to dochodzi do nasilonej ekspresji cząsteczek HSP60 oraz molekuł adhezyjnych [100]. HSP następnie wiążą się z komórkami prezentującymi antygen (w warunkach stresu komórkowego białka HSP60 są prezentowane komórkom CD8<sup>+</sup> oraz komórkom CD4<sup>+</sup> w połączeniu odpowiednio z receptorami MHC klasy I oraz MHC klasy II [332]), nasilają produkcję wielu cytokin [213] oraz dodatkowo stymulują ekspresję cząsteczek adhezyjnych. Reakcja organizmu na HSP60 dotyczy zarówno pierwotnej jak i nabytej odpowiedzi immunologicznej [300]. Ze względu na silnie zachowaną w ewolucji strukturę HSP, za każdym razem kiedy dochodzi do infekcji bakteryjnej, układ immunologiczny gospodarza, dzięki obecności komórek pamięci immunologicznej uczulonych na HSP, skierowuje swoją odpowiedź w kierunku białek z rodziny HSP60 [254]. W konsekwencji następuje stymulacja zarówno odpowiedzi komórkowej jak i humoralnej skierowana przeciwko HSP60. Pobudzone przez HSP60 limfocyty T wnikają do błony wewnętrznej naczyń, inicjują jako pierwsze proces zapalny, który następnie przyciąga monocyty/makrofagi i SMCs. Pojawienie się autoprzeciwciał anty-HSP60 dodatkowo nasila całe to zjawisko. Zwolennicy autoimmunologicznej koncepcji miażdżycy uważają, że początkowy etap, tj. etap lokalnego zapalenia jest odwracalny, ale długotrwałe utrzymywanie się czynników ryzyka prowadzi do nasilenia zjawiska, powstania blaszki miażdżycowej i związanych z nią konsekwencji. Ostatnie wyniki badań potwierdzają, iż u osób jeszcze bez klinicznych objawów miażdżycy, już na etapie wczesnych zmian miażdżycowych pojawiają się limfocyty T aktywowane przez HSP60, czyli koncepcja, iż rozpoznanie epitopów HSP60 przez limfocyty T może zainicjować proces powstawania miażdżycy wydaje się być poprawna [4]. Grundtman podkreśla, że miażdżycą jest ceną, jaką płaci ludzkość za naturalną odporność anty-HSP60, ujawniającą się w stanie długotrwałej ekspozycji naczyń tętniczych na działanie wielu różnorodnych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego [100, 101]. Ponadto, wraz z Wickiem, dowodzi ona, że liczne czynniki ryzyka mogą oddziaływać na śródbłonek naczyniowy i zapoczątkowywać pierwszy zapalno-immunologiczny etap miażdżycy, nawet u osób ze stężeniami cholesterolu we krwi mieszczącymi się w granicach rekomendowanych dzisiaj wartości referencyjnych. Wspomniani naukowcy przypuszczają, że z ewolucyjnego punktu widzenia stężenia cholesterolu we krwi, które są dziś uważane za prawidłowe w rzeczywistości są ciągle jeszcze za wysokie [100, 101]. Swoje przypuszczenia opierają na danych epidemiologicznych, z których wynika, że aż 60% chorych z klinicznymi objawami miażdżycy charakteryzuje się prawidłowym stężeniem całkowitego cholesterolu oraz frakcji LDL cholesterolu w surowicy krwi.

Można zauważyć, że w miażdżycy układ odpornościowy jest stale pobudzany, m.in. przez różnego rodzaju przetrwałe bodźce prozapalne [272]. Kluczowe w tym wypadku są mechanizmy wrodzonej odporności, które w warunkach ekspozycji na egzogenne oraz endogenne PAMPs indukują, a następnie podtrzymują procesy zapalne [48]. Układ immunologiczny rozpoznaje antygeny patogenów za pośrednic-

twem licznych receptorów, w tym m.in. receptorów z rodziny TLR, należących do grupy receptorów rozpoznających wzorce molekularne (ang. *Pattern Recognition Receptors*, PRR). TLR rozpoznają PAMPs. Rodzaj TLR, zaangażowanych w rozpoznanie ligandu, decyduje o tym jak będzie wyglądała odpowiedź immunologiczna.

Należy podkreślić, że w licznych badaniach wykazano obecność *Chlamydia pneumoniae* w blaszkach miażdżycowych, a w części z tych badań potwierdzono udział tego patogenu w indukowaniu zapalenia oraz odpowiedzi typu Th1. Wspomniana możliwość wystąpienia immunologicznych reakcji krzyżowych wskazuje na fakt, że jeden z najstarszych mechanizmów, który chroni komórki przed działaniem niekorzystnych czynników środowiskowych, mógłby jednocześnie zapoczątkowywać proces autoimmunologiczny, w następstwie którego, pod wpływem powstałych przeciwciał anti-HSP60/65, dochodzić by mogło do dysfunkcji śródbłonna naczyniowego i zapoczątkowania procesu aterosogenezy. W tej sytuacji HSP odgrywałyby główną rolę, jako cel krzyżowej reakcji immunologicznej z antygenami głównie *Chlamydia pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* lub *Escherichia coli* [243], umożliwiającej pobudzenie zarówno limfocytów Th, jak i limfocytów T cytotoksycznych (ang. *cytotoxic T-lymphocytes*, Tc) [216, 229].

W miażdżycy potwierdzono istnienie zależności pomiędzy reakcją immunologiczną przeciwko białkom HSP60/HSP65 a infekcjami bakteryjnymi [203, 330]. Udział przewlekłych infekcji w patogenezie ludzkiej miażdżycy jest przedmiotem ciągłych badań. Ich efektem jest stale wydłużająca się lista patogenów mogących przyczynić się do rozwoju miażdżycy, na której oprócz poprzednio wspomnianych pojawiają się takie mikroorganizmy jak *Cytomegalovirus* [29], *Helicobacter pylori* [8, 141] oraz *Porphyromonas gingivalis* [294]. W tym świetle, próby leczenia miażdżycy antybiotykoterapią nie wydają się zupełnie bezpodstawne. Zaobserwowano m.in., że eradykacja *Helicobacter pylori* u myszy uprzednio zainfekowanych tą bakterią skutecznie redukowała miażdżycę poprzez modulację równowagi Th1/Th2 [8]. Z drugiej strony należy podkreślić, że nie wszystkie wyniki badań odnośnie do udziału przewlekłych infekcji w patogenezie miażdżycy są jednoznaczne [46, 53].

W obliczu braku spójności w interpretacji dodatnich odczynów serologicznych w stosunku do potencjalnie miażdżycogennych patogenów, powstała hipoteza o skumulowanym efekcie różnych czynników (tzw. „obciążeniu infekcyjnym”) [190].

## 2.3. Odrębności miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek

### *Epidemiologia*

Szacuje się, że PChN w różnych stadiach zaawansowania dotyczy około 6–15% populacji, i nawet w regionach dobrze rozwiniętych gospodarczo, z ustabilizowaną od wielu lat pozycją terapii nerkozastępczej widać wyraźną tendencję wzro-

stową liczby chorych ze schyłkową postacią choroby, którzy wymagają leczenia nerkozastępczego (wzrost rocznie o 4–6%) [259]. Ze statystyk światowych wynika, że pod koniec 2010 roku na świecie żyło 2 622 000 pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek (ang. *end-stage renal disease*, ESRD), z czego blisko 2 miliony wymagało leczenia za pomocą dializoterapii [69]. Mimo rozwoju technik dializacyjnych i coraz lepszej opieki medycznej, nadal zauważalnym problemem była wysoka śmiertelność, która oscylowała w Europie na poziomie ok. 15%. Najczęstszą przyczynę zgonów wśród chorych z ESRD stanowiły choroby sercowo-naczyniowe [259, 260], które odpowiadały za 35–50% zgonów. Nawet po stratyfikacji czynników ryzyka względem wieku, płci, chorób współistniejących, w tym cukrzycy, umieralność z przyczyn sercowo-naczyniowych wśród pacjentów dializowanych była średnio 10–20 razy większa w porównaniu z populacją ogólną. Co drugi zgon osoby dializowanej był wynikiem choroby układu sercowo-naczyniowego, co piąty spowodowany był zawałem mięśnia sercowego. Pięcioletnie przeżycie w grupie osób dializowanych, bez względu na typ dializy, osiągała jedynie jedna trzecia pacjentów [291, 304].

#### *Wielkość filtracji kłębuszkowej a choroby sercowo-naczyniowe – związek przyczynowo-skutkowy?*

Nasuwa się w tym miejscu pytanie czy istnieje związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy wielkością GFR a chorobami sercowo-naczyniowymi? Większość badaczy odpowie twierdząco, wskazując na wyniki wielu badań [81, 90, 273, 274, 317, 318], w których pacjenci z PChN charakteryzowali się zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym. Z drugiej jednak strony trzeba pamiętać, iż nie wszystkie badania dały tak jednoznaczną odpowiedź [169]. Przykładem może być badanie *Womens's Health Study*, przeprowadzone na grupie prawie 28 tysięcy białych kobiet w wieku  $\geq 45$  lat, które w momencie zakwalifikowania do badania nie miały w wywiadzie choroby sercowo-naczyniowej oraz innej poważnej choroby, w tym objawowej choroby nerek [169]. Wyniki tego randomizowanego badania ukazały brak związku pomiędzy wielkością GFR a ryzykiem wystąpienia jakiegokolwiek incydentu sercowo-naczyniowego oraz śmierci z jakiegokolwiek przyczyny. Gdy jednak porównywano wyniki kobiet pomiędzy sobą, gdzie punktem odniesienia były kobiety zakwalifikowane do grupy charakteryzującej się  $GFR \geq 90$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>, to zaobserwowano, że jedynie osoby z  $GFR < 60$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> wykazywały zwiększone ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych. Łagodne i umiarkowane obniżenie GFR pozostawało bez wpływu na ryzyko sercowo-naczyniowe.

Skąd te rozbieżności? Wydaje się, że jedną z ich przyczyn może być dobór grupy badanej. Należy zauważyć, że wyniki potwierdzające istnienie zależności pomiędzy upośledzeniem funkcji nerek a ryzykiem sercowo-naczyniowym pochodzą głównie z badań prowadzonych wśród pacjentów z ciężką dysfunkcją nerek, obciążonych wysokim ryzykiem lub z już rozpoznaną chorobą sercowo-naczyniową.

Czy miażdżycy pacjentów z PChN wyróżnia się w jakiś szczególny sposób w porównaniu z miażdżycą stwierdzaną u chorych bez PChN? Na to pytanie trudno dziś znaleźć jednoznaczną odpowiedź. Po raz pierwszy terminu przyspieszona miażdżycy, w odniesieniu do pacjentów leczonych przewlekłą hemodializą, użył w 1974 roku Lindner i wsp. [183]. Co prawda już wkrótce potem w ogóle zakwestionowano występowanie tego zjawiska [37]. Sytuacja stała się jeszcze bardziej złożona, gdy w 1982 roku Degoulet i wsp. zaobserwowali w grupie pacjentów leczonych dializą, iż podwyższone stężenie całkowitego cholesterolu, które od lat jest uznanym tradycyjnym czynnikiem ryzyka sercowo-naczyniowego wiąże się z lepszym rokowaniem w tej grupie chorych [60]. Skąd ten paradoks? Do dziś dokładnie nie wiadomo. Nadal toczy się bowiem debata na temat przyczyn zmniejszonego wpływu tradycyjnych czynników ryzyka na choroby sercowo-naczyniowe u chorych z PChN, wśród których główne wątpliwości dotyczą właśnie zaburzeń lipidowych oraz nadciśnienia tętniczego. Liczne wyniki badań doświadczalnych potwierdzają istnienie tego paradoksu [50, 72, 139, 159, 186, 223, 248]. Zauważono, szczególnie u chorych dializowanych, że osoby o małej masie (niedożywione), z niskim stężeniem cholesterolu i homocysteiny we krwi oraz obniżonym ciśnieniem skurczowym częściej zapadają na choroby sercowo-naczyniowe. Są one prawdopodobnie wyrazem niedożywienia, które jest przyczyną niedoboru substancji niezbędnych do życia [52]. W 2003 roku Kalantar Zadeh i wsp. po raz pierwszy odnieśli się w sposób jednoznaczny do istnienia zjawiska, opisywanego już wcześniej przez innych badaczy, przy pomocy terminów: *risk-factor paradox* [72, 223, 248] oraz *reverse epidemiology* [50, 139] i opublikowali swoje spostrzeżenia na łamach renomowanego czasopisma *Kidney International*, niejako w ten sposób uzmysławiając wielu badaczom, że taki problem w ogóle występuje [137]. Należy jednak pamiętać, co zaznaczył również Kalantar-Zadeh, że *reverse epidemiology* niekoniecznie oznacza, że podłoże powstawania blaszki miażdżycowej w PChN jest inne niż w miażdżycy u osób bez PChN. Przyczyna może być bowiem taka, że inne czynniki typowe jedynie dla PChN, nazywane często czynnikami ryzyka związanymi z mocznicą (ang. *uremia-associated risk factors*), mogą być na tyle dominujące, że powodują ten pozorny paradoks.

Istnienie tego, nawet jeśli tylko pozornego, paradoksu wymaga zastanowienia się nad tym zagadnieniem i być może weryfikacji naszej dotychczasowej wiedzy na temat miażdżycy w PChN oraz jej czynników ryzyka. Dla ścisłości należy dodać, że to intrygujące zjawisko *odwrotnej epidemiologii* zaobserwowano także wśród chorych bez PChN, m.in. u pacjentów z przewlekłą niewydolnością serca [138], wśród osób starszych [289, 310] oraz w grupie chorych hospitalizowanych z różnych powodów, gdzie niska wartość BMI wiązała się z gorszym rokowaniem [172], co czyni zagadnienie miażdżycy, w ogólności, jeszcze bardziej interesującym.

Oczywiste wątpliwości nasuwają się także, jeśli chodzi o leczenie. Czy powinniśmy w takim razie leczyć zaburzenia lipidowe i redukować nadciśnienie-



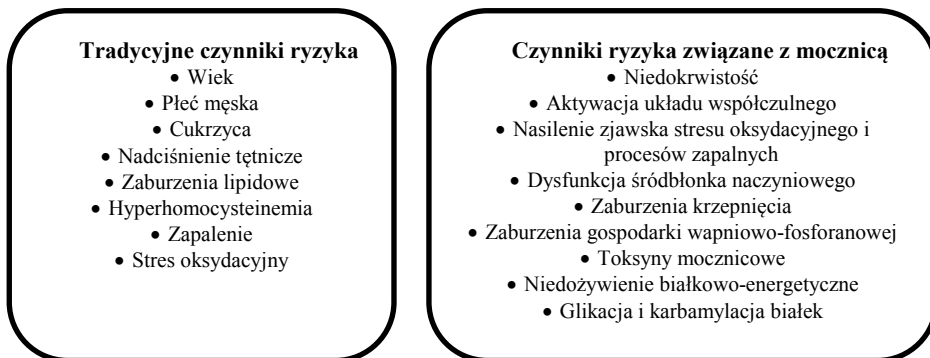
nie w PChN, skoro ich występowanie może poprawiać rokowanie w tej grupie chorych? I tu odpowiedzi są niejednoznaczne. Chociaż, w dwóch prestiżowych czasopismach medycznych opublikowano niedawno wyniki metaanaliz dotyczące wpływu leczenia nadciśnienia tętniczego na sercowo-naczyniowe punkty końcowe u chorych leczonych nerkozastępczo [113] oraz wśród chorych z nadciśnieniem tętniczym w okresie przed-dializacyjnym [12], z których płyną wnioski, iż leki hipotensyjne znamienne zmniejszają ryzyko incydentów sercowo-naczyniowych w PChN, to naukowcy nadal mają wątpliwości [99]. Jeśli bowiem dokładnie przejrzyć wyniki wspomnianych metaanaliz, to wygląda na to, że nieleczenie nadciśnienia w omawianej grupie chorych będzie równie dobre, jak stosowanie takiego leczenia [99]. Także wyniki innych randomizowanych badań, tj. *4D Study* [315] i *Aurora* [71] nie wykazały w grupie pacjentów hemodializowanych zmniejszenia liczby incydentów sercowo-naczyniowych pomimo obniżenia stężeń całkowitego cholesterolu i cholesterolu we frakcji LDL. Istnieje kilka możliwych interpretacji tych wyników [65]. Z jednej strony, albo cholesterol nie jest najważniejszym czynnikiem patogenetycznym miażdżycy obserwowanej w PChN, albo miażdżycy nie ma najistotniejszego wpływu na zachorowalność i śmiertelność z powodu chorób sercowo-naczyniowych w PChN, albo aby uzyskać pozytywne wyniki takiego leczenia należałoby je rozpocząć zanim pacjent z PChN osiągnie stadium ESRD. Wyniki kolejnej metaanalizy zdają się sprzyjać ostatniej hipotezie, że statyny zastosowane u pacjentów w okresie przed-dializacyjnym zmniejszają ryzyko śmiertelności z powodów przyczyn sercowo-naczyniowych, a także z powodu wszystkich innych przyczyn [221]. Z kolei największe na świecie badanie oceniające korzyści z obniżenia stężenia cholesterolu u chorych z przewlekłymi chorobami nerek (ang. *Study of Heart and Renal Protection, SHARP*) [11] wykazało, że około jednej czwartej wszystkich zawałów mięśnia sercowego, udarów mózgu i liczby zabiegów rewaskularyzacji naczyń tętniczych u osób z PChN można uniknąć dzięki stosowaniu leków obniżających stężenie cholesterolu w surowicy krwi. Ponadto w badaniu tym zaobserwowano, że to obniżenie daje takie same efekty bez względu na stadium zaawansowania PChN. Przytoczone wyniki najważniejszych metaanaliz i randomizowanych badań opublikowanych w ostatnich latach ukazują wyraźnie, że istnieją rozbieżności w kwestii zaburzeń lipidowych w PChN.

Badacze wskazują na dodatkowy udział u tych chorych tzw. nowych czynników ryzyka, związanych bezpośrednio z przewlekłym procesem zapalnym, silnie nasilonym w grupie chorych leczonych nerkozastępczo, szczególnie hemodializami. Podkreśla się tu znaczenie m.in. interleukin 1 i 6, czynnika martwicy nowotworów- $\alpha$ , stresu oksydacyjnego, modyfikowanych białek oraz produktów zaawansowanej glikacji białek [231].

Poza tradycyjnymi i nietradycyjnymi czynnikami ryzyka zwraca się uwagę na znaczenie czynników specyficznych, wynikających z choroby nerek, takich jak

zaburzenia homeostazy wapniowo-fosforanowej, nadczynność przytarczyc, hiperurykemia i obecność toksyn mocznicowych, których jest ponad 100.

Czynniki tradycyjne i nietradycyjne miażdżycy występujące u chorych z PChN, szczególnie w stadium niewydolności, nerek zostały przedstawione na rycinie 6.



**Rycina 6.** Tradycyjne i nietradycyjne czynniki ryzyka miażdżycy występujące u chorych z PChN, szczególnie w stadium niewydolności nerek (na podstawie [65]).

## 3. Systemowe podejście do badania procesu powstawania i rozwoju miażdżycy

### 3.1. Podstawowe idee biologii i medycyny systemowej

Konieczność postrzegania elementów świata ożywionego jako części pewnego systemu doprowadziła na początku XXI wieku do powstania i dynamicznego rozwoju biologii i medycyny systemowej. W dziedzinach tych zakłada się, że w zależności od poziomu organizacji, geny, komórki, narządy, organizmy, ekosystemy wzajemnie na siebie oddziałują, a natura tych oddziaływań, oraz ich siła i sieć powiązań między ich elementami są przedmiotem badań. Należy tu wspomnieć, że dziedziny te czerpią w dużym stopniu z nauk systemowych, związanych do niedawna przede wszystkim z naukami technicznymi, a mających swoje korzenie w ogólnej teorii systemów i cybernetyce. Duże zainteresowanie biologią i medycyną systemową oraz ich szybki rozwój wynikają z faktu, iż coraz powszechniej uważa się, że dalszy istotny postęp w naukach biologicznych i w medycynie może być możliwy dzięki zastosowaniu precyzyjnych metod analizy systemowej. Jednym z, być może odległych, ale niezwykle istotnych, celów obu dziedzin jest stworzenie na tyle dokładnych modeli organizmów żywych, aby na ich podstawie możliwe było precyzyjne sterowanie nimi (podobnie jak to ma miejsce w przypadku systemów technicznych). Możliwość taka miałaby ogromne znaczenie m. in. dla medycyny. Organizm chorego człowieka można by bowiem postrzegać jako system znajdujący się w niewłaściwym stanie. Jeśli na podstawie dokładnego modelu takiego systemu byłaby możliwa precyzyjna zmiana jego stanu ze stanu niewłaściwego na właściwy, czyli ze stanu choroby na stan bez choroby, byłoby to równoważne wykryciu i zastosowaniu niezawodnej terapii danego schorzenia. Wyniki uzyskane w ten sposób można by następnie sprawdzać i weryfikować już w sposób bezpośredni w laboratoriach.

Pierwszym, ale bardzo złożonym krokiem na drodze do osiągnięcia tego celu jest opracowanie odpowiednich metod modelowania. Jednym z narzędzi matematycznych, które można w tym celu wykorzystać są sieci Petriego, które z jednej strony posiadają intuicyjną reprezentację graficzną, a z drugiej strony pozwalają na precyzyjną analizę własności modelu zbudowanego za pomocą tych sieci. Sieci Petriego są coraz częściej wykorzystywane do modelowania złożonych systemów biologicznych, w tym istotnych procesów zachodzących w organizmie człowieka [13, 112, 114, 115, 116].

Drugim krokiem na drodze do osiągnięcia wspomnianego celu jest niewątpliwie stworzenie dokładnych modeli różnych procesów biochemicznych zachodzących

dzących w organizmie człowieka. Pod pojęciem modelu rozumie się jak najwierniejszy odpowiednik rzeczywistego systemu działającego w określonym czasie i przestrzeni, prowadzący do lepszego zrozumienia rzeczywistości. Przy projektowaniu nowego modelu powinno się rozpatrywać każdy jego nowy element oraz jego funkcję, pamiętając jednocześnie o jego wpływie na elementy sąsiednie, całość systemu oraz sąsiednie systemy.

Należy w tym miejscu podkreślić niezwykle istotną rolę relacji systemowych, tzn. relacji między własnościami poszczególnych części, które tworzą celowo zorientowaną całość. Liczba tych relacji i ich skomplikowanie zostały najwcześniej zauważone w biologii teoretycznej, w której już w latach dwudziestych XX wieku powstało nowatorskie podejście do organizmu jako do systemu. Zostało ono zaproponowane przez Ludwiga von Bertalanffa, austriackiego biologa i filozofa, uznawanego za twórcę podstaw ogólnej teorii systemów [311, 312, 313]. Naczelną zasadą tej teorii jest całościowe ujmowanie rzeczywistości, będące w opozycji do tzw. podejścia redukcjonistycznego, panującego powszechnie w nauce od czasów Newtona i Kartezjusza. Paradygmatem tego podejścia jest podział badanego obiektu lub problemu na części składowe i, poprzez zastosowanie kolejnych uproszczeń, dokonywanie analiz jego oddzielnych elementów, aby w ten sposób wnioskować o zachowaniu się całości. Wydaje się jednak, że podejście to może być właściwe, jedynie w przypadku badań prowadzonych na obiektach prostych, czyli takich, które charakteryzują się małą złożonością. Organizm człowieka niewątpliwie do takich prostych obiektów nie należy. Wobec tego celowe jest podejście doń w sposób całościowy, czyli systemowy, opierający się na założeniu, że wszelkie procesy zachodzące w ludzkim organizmie można dokładnie poznać i zrozumieć jedynie wtedy, gdy będą one analizowane jako całość z jednoczesnym dokładnym uwzględnieniem wszystkich znanych nam zależności i wpływu znanych nam czynników. Wiadomo, że złożoność jest nieodłącznym atrybutem natury, a nie następstwem wielu prostych procesów zachodzących na bardziej elementarnym poziomie. W ostatnim dziesięcioleciu, takim podejściem zajęła się medycyna systemowa, nowa dziedzina z pogranicza medycyny, biologii, informatyki i matematyki. Skupia się ona na wielodyscyplinarnych badaniach integrujących szeroki wachlarz danych biologicznych, medycznych i klinicznych w celu zrozumienia i modelowania złożonych procesów stanowiących podłoże ludzkich chorób.

Stworzenie jak najbardziej precyzyjnych, bo tylko takie są użyteczne, modeli różnych złożonych procesów, w tym również procesów zachodzących w organizmie człowieka, może okazać się nietrywialne i wymagać będzie czasami wiedzy, którą obecnie nie dysponujemy. Stąd modele te będą często zawierały w sobie część wynikającą z rzeczywistej wiedzy na temat danego procesu/zjawiska, opartej na wynikach konkretnych badań oraz część bazującą jedynie na hipotezach. Dlatego, trzeba tutaj podkreślić, że każdy taki model będzie często stanowił jedy-

nie przybliżony opis wybranego fragmentu rzeczywistości, co może powodować, i zapewne w wielu przypadkach będzie powodowało, iż przewidywania poczynione w oparciu o niego nie będą się dokładnie zgadzały z zachowaniem danego systemu w rzeczywistości. Jednak w przypadku dobrych modeli taka zgodność powinna być daleko posunięta i aby ją sprawdzić każdy model powinien być zweryfikowany.

Aby zweryfikować hipotezy zawarte w stworzonych modelach oraz sprawdzić, czy nasza aktualna wiedza na temat danego zjawiska jest pełna, niewątpliwie trzeba będzie wykonać symulację takiego modelu i sprawdzić jak się on zachowuje. Metoda weryfikacji modelu jest stosunkowo prosta i polega na tym, że w oparciu o zachowanie modelu prowadzi się pewne przewidywania, i następnie sprawdza się je poprzez wykonanie odpowiednich badań rzeczywistego systemu. Jeśli wyniki tych badań będą zgodne z przewidywaniami, to będzie to oznaczało, że nasz model jest w pewnym, czyli w tym zweryfikowanym zakresie poprawny. Jeżeli natomiast uzyskamy rozbieżne wyniki pomiędzy stworzonym systemem a systemem rzeczywistym, będzie to oznaczać, że albo w modelu jest błąd, albo że badania weryfikujące zawierają błąd. Ten drugi błąd, o ile to on będzie stanowił przyczynę zauważonych rozbieżności, będzie można w miarę łatwo wyeliminować poprzez powtórzenie badań eksperymentalnych. Natomiast ten pierwszy błąd, czyli ten stwierdzany w samym modelu, może być trudniejszy do usunięcia. Obserwowane rozbieżności mogą bowiem wynikać nie tyle z błędów tkwiących w samym modelu, ile z ograniczonej precyzji modelu, co należy rozumieć w ten sposób, że być może w trakcie tworzenia modelu danego procesu pominięto pewne aspekty, które mają istotny wpływ na wynik weryfikującego eksperymentu. Innymi słowy, czasem na podstawie analizy zachowania takiego modelu będzie można wykryć nowe „miejsca”, którym będą odpowiadały dobrze znane lub całkowicie nowe substancje lub może się okazać, że trzeba będzie uwzględnić udział czynników, których nie brano wcześniej pod uwagę przy tworzeniu modelu, bo bez nich model będzie się zachowywał w sposób nieprawidłowy.

Trzeba się w tym miejscu zastanowić, jak to jest możliwe, aby model zbudowany w oparciu o dostępną wiedzę dotyczącą modelowanego systemu był źródłem wniosków, które mogą się okazać niezgodne z tą wiedzą i by okazały się być prawdziwe? Może się to wydać niemożliwe, należy jednak podkreślić, że precyzyjny formalny model może zawierać pewne zależności pomiędzy składnikami modelowanego systemu/procesu, które czasem trudno zauważyć w mniej formalnym jego opisie, w oparciu o który stworzono model formalny.

Tak więc projektowanie modeli może stać się inspiracją do poszukiwania nowych czynników/substancji/cząsteczek lub do poznawania ich zupełnie nowych własności, które będą wynikały jedynie z analizy dobrze zbudowanego modelu danego zjawiska/procesu.

## 3.2. Wybrane zagadnienia związane z modelowaniem procesów biologicznych za pomocą sieci Petriego

### 3.2.1. Wprowadzenie do teorii sieci Petriego

#### A. Opis nieformalny sieci Petriego [199, 214, 234, 247, 120, 263]

Sieci Petriego są matematycznym i graficznym narzędziem służącym do modelowania różnych systemów i zachodzących w nich procesów. Za ich pomocą można modelować takie cechy jak zrównoleglenie, asynchroniczność oraz losowość.

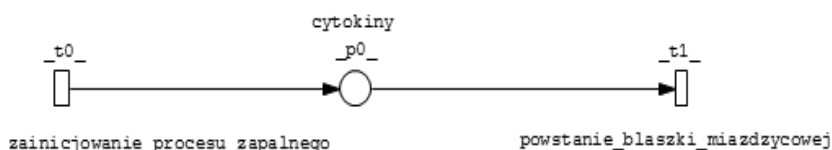
Sieci te przedstawia się w postaci skierowanych grafów dwudzielnych, co oznacza, że zbiór ich wierzchołków można podzielić na dwa rozłączne podzbiory w taki sposób, że każdy łuk występujący w takiej sieci prowadzi od wierzchołka należącego do jednego z tych podzbiorów do wierzchołka będącego elementem drugiego podzbioru. Innymi słowy, nie ma w grafie dwudzielnym łuków, które łączyłyby dwa wierzchołki należące do tego samego podzbioru. W przypadku sieci Petriego jeden z takich podzbiorów zawiera wszystkie *miejsca* ( $p$ ) – odpowiedniki biernych składników sieci, a drugi wszystkie *tranzycje* (*przejścia*) ( $t$ ) – odpowiedniki aktywnych elementów sieci. Zatem *łuki*, czyli połączenia pomiędzy podzbiarami takiej sieci muszą mieć początek w pewnej tranzycji, a koniec w pewnym miejscu lub odwrotnie. Nie są natomiast dozwolone połączenia typu: tranzycja–tranzycja lub miejsce–miejsce.

Miejsca stanowią odpowiedniki pewnych biernych elementów modelowanego systemu i w przypadku systemów biologicznych mogą one odpowiadać związkom chemicznym, natomiast tranzycje reprezentują aktywne elementy systemu i opisują zdarzenia, reakcje lub procesy, jakie w tym systemie mogą zachodzić. Łuki, obok miejsc i tranzycji, wyznaczają strukturę sieci i reprezentują pewne zależności przyczynowe występujące pomiędzy aktywnymi elementami sieci, tj. wspomnianymi tranzycjami i miejscami.

Istnieją dwa rodzaje tranzycji, tj. tranzycje wejściowe oraz tranzycje wyjściowe. *Tranzycje wejściowe* to takie tranzycje, które nie mają żadnych wejściowych miejsc i zawsze są aktywne, innymi słowy przedstawiają one zdarzenia/reakcje/procesy początkowe, np. taką tranzycją wejściową może być zainicjowanie procesu zapalnego w organizmie. Natomiast tranzycje wyjściowe to takie tranzycje, które nie mają żadnych wyjściowych miejsc, odpowiadają one końcowym zdarzeniom/reakcjom/procesom, do których dąży model, np. efektem zainicjowanego procesu zapalnego może być powstanie blaszki miażdżycowej, które w modelu będzie stanowiło tranzycję wyjściową. Często tego typu tranzycje są także używane w celu przedstawienia interakcji pomiędzy modelowanym systemem a innymi systemami [264]. W jednym modelu może być wiele tranzycji wejściowych i wyjściowych.

W graficznej reprezentacji sieci Petriego miejsca przedstawiane są za pomocą okręgów, tranzycje za pomocą kwadratów, tranzycje wejściowe i wyjściowe za pomocą prostokątów, a łuki standardowo są oznaczane za pomocą strzałek z opcjonalną liczbą nad nimi określającą tzw. *wagę łuku*.

Na rycinie 7. przedstawiono przykładową sieć z uwzględnieniem tranzycji wejściowej, tranzycji wyjściowej oraz jednego miejsca. Tranzycja wejściowa ( $t_0$ ) odpowiada zainicjowaniu procesu zapalnego w świetle naczynia tętniczego, miejsce ( $p_0$ ) to aktywny element sieci, w tym przypadku, cytokiny, których uwalnianie zostało uruchomione pod wpływem procesu zapalnego, a tranzycja wyjściowa ( $t_1$ ) odpowiada końcowemu etapowi, do którego zmierzał modelowany proces, tj. powstaniu blaszki miażdżycowej.



**Rycina 7.** Przykładowa sieć przedstawiająca tranzycję wejściową ( $t_0$ ), tranzycję wyjściową ( $t_1$ ) oraz jedno miejsce ( $p_0$ ).









Sieci, które przedstawiają procesy biologiczne zachodzące w organizmach żywych posiadają zazwyczaj bardzo złożoną strukturę, stąd dla zwiększenia czytelności takich sieci, wprowadzono tzw. *miejsca logiczne*. Miejsca logiczne, to takie miejsca w sieci, które mogą być graficznie reprezentowane w wielu jej miejscach. Jeśli w danym procesie np. cytokiny z ryciny 1. są niezbędne dla odpalenia kilku tranzycji  $t_m$ , to zamiast rysować łuki odczytu pomiędzy miejscem ( $p_0$ ) i kolejnymi tranzycjami ( $t_m$ ), można zastosować w tych kilku miejscach miejsce logiczne, reprezentowane w sieci w postaci zacienionego okręgu.

Tranzycje, miejsca i łuki tworzą jedynie strukturę sieci i w związku z tym same nie wystarczają do tego, aby zaistniała dynamika w sieci i, aby dana sieć mogła być wykorzystana do modelowania procesów biologicznych/biochemicznych, które charakteryzują się taką dynamiką.

Dynamika pojawia się w sieci dopiero wówczas, gdy wprowadzi się do niej *znaczniki (tokeny)* oraz związane z nimi zasady aktywacji tranzycji, opisane poniżej. Tokeny przepływają z miejsc poprzez tranzycje do kolejnych miejsc. W każdym momencie każde z miejsc może zawierać zero lub pewną całkowitą liczbę znaczników, które można interpretować jako obecność w systemie określonej liczby pewnego rodzaju cząsteczek reprezentowanych przez dane miejsce.

Na schemacie graficznym sieci znaczniki reprezentowane są za pomocą kropek umieszczonych w miejscach lub, gdy jest ich w danym miejscu kilka za pomocą odpowiadającej im liczby. Podstawowe elementy sieci Petriego i ich graficzna reprezentacja zostały zaprezentowane w tabeli 1.

**Tabela 1.** Elementy sieci Petriego i ich graficzna reprezentacja w sieci

Elementy sieci Petriego	Graficzna reprezentacja w sieci
Tranzycja	
Tranzycja wejściowa, tranzycja wyjściowa	
Miejsce	
Miejsce logiczne	
Łuk z wagą łuku równą 1	
Łuk z wagą łuku równą 4	
Łuk odczytu	
Znacznik (token)	

Wspomniana zasada aktywacji tranzycji określa, czy dana tranzycja jest aktywna, tzn. czy może zostać wykonana (odpalona, uruchomiona). Zasady aktywacji tranzycji zostały przedstawione poniżej.

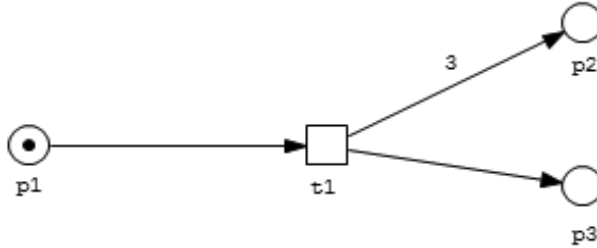
1. Tranzycja  $t$  jest aktywna, gdy w każdym miejscu  $p$ , dla którego istnieje łuk  $(p, t)$  znajduje się co najmniej  $W(p, t)$  znaczników. Innymi słowy, tranzycja jest aktywna wtedy, gdy w każdym z poprzedzających ją miejsc znajduje się liczba znaczników, która jest co najmniej równa wadze łuku łączącego to miejsce z tranzycją. Brak liczby nad łukiem oznacza, iż waga równa jest 1, tzn., że dane zdarzenie zaistnieje tylko wtedy, gdy jeden znacznik przepłynie z tej konkretnej tranzycji do danego miejsca.
2. Aktywna tranzycja może, ale wcale nie musi zostać odpalona. Kolejność odpalania aktywnych tranzycji jest losowa.
3. Uruchomienie aktywnej tranzycji  $t$  powoduje zabranie z każdego poprzedzającego daną tranzycję, miejsca  $p$  dokładnie  $W(p, t)$  tokenów i dodanie do każdego miejsca wyjściowego  $p$  danej tranzycji  $W(t, p)$  tokenów.

Należy podkreślić, że w przypadku miejsc logicznych w sieci, w każdym miejscu logicznym, które w sieci posiada takie samo oznakowanie, ilość tokenów jest zawsze taka sama. Stąd, gdy w jednym miejscu sieci odpalana jest tranzycja powodująca napływ tokenów do danego miejsca logicznego, to wszędzie w sieci w miejscach logicznych o tej samej nazwie dochodzi do zwiększenia liczby tokenów. Podobnie jest w przypadku zużywania tokenów. Gdy w jednym miejscu logicznym zużywane są tokeny, to dochodzi do zmniejszenia liczby tokenów we wszystkich miejscach logicznych, które posiadają tę samą nazwę.

Na rycinie 8. przedstawiono przykładowy schemat prostej sieci Petriego z jednym miejscem wejściowym ( $p_1$ ), dwoma miejscami wyjściowymi ( $p_2$  i  $p_3$ ) oraz jedną tranzycją ( $t_1$ ). W miejscu wejściowym znajduje się jeden znacznik. Tak jak już wspomniano powyżej, każde miejsce może mieć przypisaną początkową liczbę



znaczników, określoną przez oznakowanie początkowe ( $M_0$ ). Nad łukiem łączącym tranzycję  $t_1$  z miejscem  $p_2$  znajduje się liczba 3, czyli waga łuku łączącego te dwa podzbiory jest równa 3, co oznacza, że modelowane zdarzenie zaistnieje dopiero wtedy, gdy trzy znaczniki przepłyną do miejsca  $p_2$  i jeden znacznik do miejsca  $p_1$ .

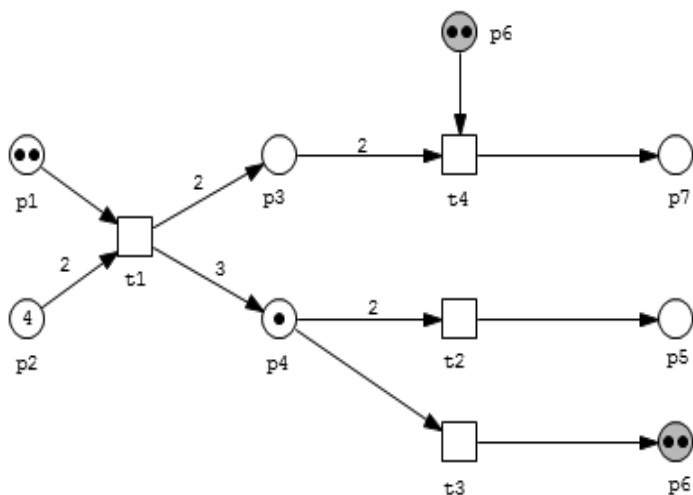


Rycina 8. Przykład prostej sieci Petriego z zaznaczonym początkowym oznakowaniem.

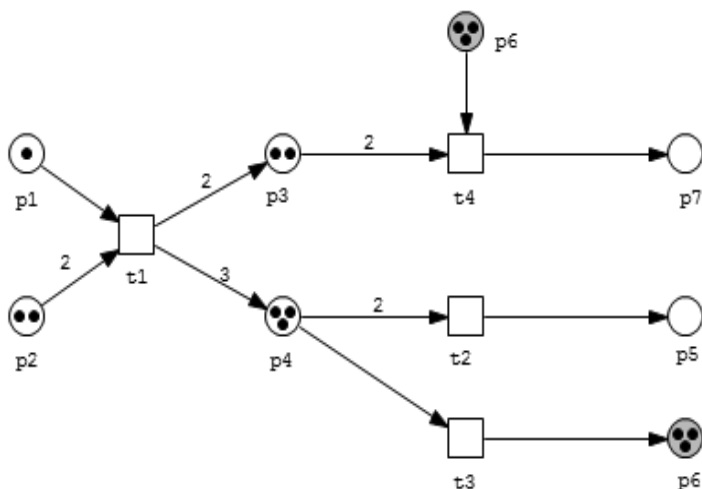
W celu przedstawienia podstawowych zasad działania sieci Petriego stworzono przykładową sieć Petriego z siedmioma miejscami, tj.  $p_1$ – $p_7$  i czterema tranzycjami tj.  $t_1$ – $t_4$ , którą pokazano na rycinach 9a–9d. Tranzycja  $t_1$  ma dwa miejsca wejściowe, tj.  $p_1$  i  $p_2$  oraz pięć miejsc wyjściowych, tj.  $p_3$ – $p_7$ , z czego trzy z nich: miejsca  $p_3$ ,  $p_4$  i  $p_6$  są jednocześnie miejscami wejściowymi odpowiednio dla tranzycji  $t_4$ ,  $t_2$  i  $t_3$  oraz  $t_4$ . Ponadto miejsce  $p_6$  jest miejscem logicznym i reprezentowane jest w dwóch miejscach w sieci. Na rycinie 9a przedstawiona jest sieć w stanie początkowym  $M_0$ , w którym miejsca  $p_1$  i  $p_6$  zawierają po dwa znaczniki, miejsce  $p_2$  cztery znaczniki, a miejsce  $p_4$  jeden znacznik. Jak widać, w tej sytuacji tranzycje  $t_1$  i  $t_4$  mogą zostać wykonane. Aktywacja tranzycji  $t_1$  wymaga, aby dwa tokeny znajdowały się w miejscu  $p_2$  (waga = 2) i jeden w miejscu  $p_1$ , co jest w tej sieci warunkiem spełnionym. Natomiast do odpalenia tranzycji  $t_3$  potrzebny jest jeden token w miejscu  $p_4$ , co także w stanie początkowym występuje. Natomiast tranzycje  $t_2$  i  $t_4$  nie mają w tym stanie szans na uruchomienie.

Stan sieci przedstawionej na rycinie 3a po uruchomieniu tranzycji  $t_1$  i  $t_3$  pokazany jest na rycinie 3b. Jako wynik wykonania tych tranzycji do miejsca  $p_3$  przepłyną dwa znaczniki (waga łuku = 2) i ich suma w tym miejscu będzie równa dwa, co wystarczy do aktywacji w następnym stanie sieci tranzycji  $t_4$ . Natomiast w miejscu  $p_4$  pojawią się dodatkowo trzy znaczniki (waga łuku = 3), czyli suma ich wyniesie cztery, z czego jeden znacznik zostanie od razu zużyty na aktywację tranzycji  $t_3$ . Po aktywacji tranzycji  $t_3$  dojdzie do przepływu jednego znacznika do miejsca logicznego  $p_6$ , gdzie tym samym liczba znaczników wzrośnie do trzech. Dwa znaczniki w tym miejscu wystarczą do aktywacji tranzycji  $t_4$ . Z kolei, w miejscu  $p_2$  ubędą 2 znaczniki i pozostaną 2, natomiast w miejscu  $p_1$  ubędzie jeden i pozostanie 1 znacznik. Ten stan sieci pozwoli w kolejnym kroku na uruchomienie tranzycji  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$  i  $t_4$ .

Na rycinie 9c zaprezentowano stan sieci z ryciny 9b po odpaleniu tranzycji  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$  i  $t_4$ . Po odpaleniu tranzycji  $t_2$  jeden token przepłynie do miejsca  $p_5$ . Natomiast



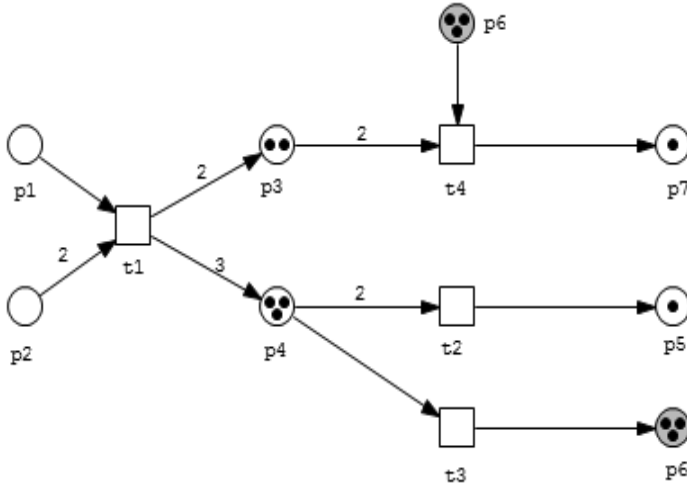
Rycina 9a. Podstawowa zasada działania sieci Petriego. Stan początkowy sieci.



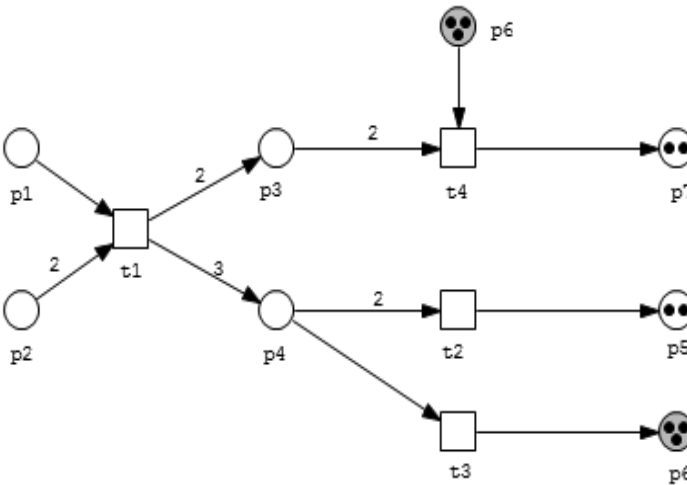
Rycina 9b. Podstawowa zasada działania sieci Petriego. Stan sieci z ryciny 9a po uruchomieniu tranzycji  $t_1$  i  $t_3$ .

po wykonaniu tranzycji  $t_3$  dodatkowo jeden znacznik przepłynie do miejsca logicznego  $p_6$ , w którym suma tokenów wzrośnie tym samym do czterech, ale jednocześnie dojdzie do uruchomienia tranzycji  $t_4$ , co z kolei doprowadzi do zużycia jednego tokena z miejsca logicznego  $p_6$ , tak więc suma tokenów w tym miejscu nie zmieni się i będzie równa trzy, dodatkowo ubędą dwa znaczniki z miejsca  $p_3$  i przybędzie jeden znacznik w miejscu  $p_7$ . Jednocześnie będzie jeszcze możliwe odpalenie tranzycji  $t_1$ , co wywoła napływ dwóch tokenów do miejsca  $p_3$  i trzech do miejsca  $p_4$ . Umożliwi to odpalenie tranzycji  $t_2$ ,  $t_3$  i  $t_4$  w następnym stanie sieci.

Na rycinie 9d ukazano końcowy stan sieci, w której doszło do aktywacji tranzycji  $t_3$  i przepływu jednego znacznika do miejsca logicznego  $p_6$ , jednocześnie z tego miejsca ubył jeden znacznik, ponieważ był potrzebny obok dwóch tokenów napływających z miejsca  $p_3$  do aktywacji tranzycji  $t_4$ . Po odpaleniu tranzycji  $t_4$  w miejscu  $p_7$  przybył dodatkowo jeden znacznik. Ponadto napływ dwóch tokenów z miejsca  $p_4$  odpalił tranzycję  $t_2$  i spowodował napływ dodatkowego znacznika do miejsca  $p_5$ . Kolejne uruchomienia tranzycji nie są już możliwe, ponieważ nie są spełnione warunki niezbędne do aktywacji tranzycji.



**Rycina 9c.** Podstawowa zasada działania sieci Petriego. Stan sieci z ryciny 9b po uruchomieniu tranzycji  $t_1, t_2, t_3$  i  $t_4$ .



**Rycina 9d.** Podstawowa zasada działania sieci Petriego. Stan sieci z ryciny 9c po uruchomieniu tranzycji  $t_2, t_3$  i  $t_4$ .

## B. Opis formalny sieci Petriego

Pod względem formalnym sieć Petriego (PN) jest uporządkowaną piątką [78, 215].

$PN = (P, T, F, W, M_0)$  gdzie:

$P = \{p_1, p_2, \dots, p_n\}$	jest skończonym zbiorem miejsc,
$T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$	jest skończonym zbiorem tranzycji,
$F \subseteq (P \times T) \cup (T \times P)$	jest zbiorem łuków prowadzących od miejsc do tranzycji i od tranzycji do miejsc,
$W : F \rightarrow \{1, 2, 3, \dots\}$	jest funkcją przypisującą wagę każdemu łukowi,
$M_0 : P \rightarrow \{0, 1, 2, 3, \dots\}$	jest oznakowaniem początkowym, odpowiada początkowemu stanowi modelowanego systemu.

Sieć Petriego bez oznakowania początkowego jest przedstawiana jako  $N = (P, T, F, W)$ , a z początkowym oznakowaniem jako  $(N, M_0)$ .

### 3.2.2. Własności behawioralne i strukturalne sieci Petriego

Sieci Petriego są obiektami matematycznymi i w związku z tym posiadają pewne konkretne własności. Własności te dzielimy na behawioralne, czyli takie, które są zależne od oznakowania początkowego sieci ( $M_0$ ) oraz strukturalne, w których analizujemy sieć bez uwzględnienia takiego oznakowania [215]. Analiza takich własności sieci pozwala dowiedzieć się czegoś więcej nie tylko o grafie, lecz umożliwia pozyskanie informacji o systemie, do którego modelowania taki graf jest wykorzystywany.

Do istotnych behawioralnych własności sieci Petriego zaliczamy [30]:

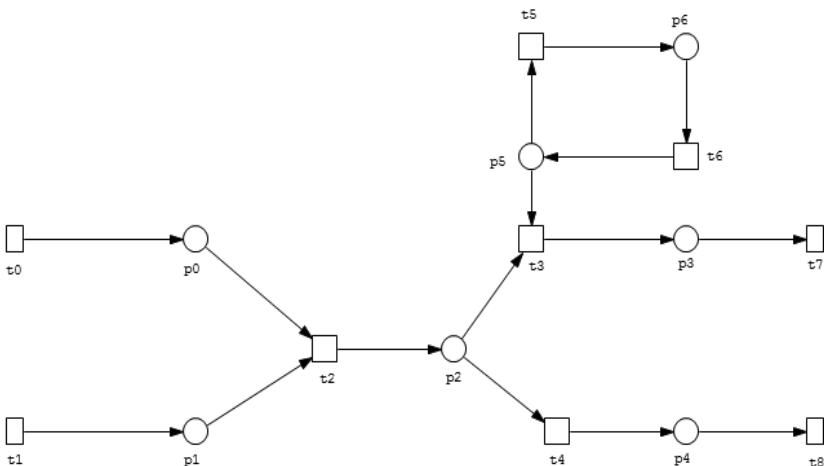
- **Osiągalność** (ang. *reachability*) jest to jedna z podstawowych własności sieci Petriego. Problem osiągalności sprowadza się do określenia, czy dane oznakowanie jest osiągalne z początkowego markowania, czyli czy istnieje taka sekwencja odpaleń tranzycji, po odpaleniu których przy oznakowaniu początkowym  $M_0$  otrzymamy oznakowanie  $M_n$ .
- **Żywotność** (ang. *liveness*) – weryfikuje ile razy dana tranzycja będzie odpalana. Żywotność można określić dla każdej tranzycji oraz dla całej sieci. Dla każdej tranzycji  $t$  w sieci  $(N, M_0)$  możemy zdefiniować jej poziom żywotności w skali od 0 do 4, gdzie 0 – oznacza brak żywotności, sieć tzw. martwą.
- **Ograniczoność** (ang. *boundedness*). Używamy określenia, że dana sieć jest ograniczona, jeżeli dla każdego oznakowania osiągalnego z  $M_0$  liczba znaczników w każdym z miejsc sieci nie jest większa niż  $k$ , gdzie  $k$  jest pewną nieujemną liczbą całkowitą. Jeżeli  $k = 1$ , to określamy sieć jako sieć bezpieczną.
- **Stabilność** (ang. *persistance*). Sieć jest stabilna wtedy, gdy po aktywacji tranzycji jest ona aktywna tak długo dopóki nie zostanie odpalona.
- **Odwracalność** (ang. *reversibility*). Jeżeli dla każdego oznakowania  $M$  osiągalnego z  $M_0$  oznakowanie  $M_0$  jest osiągalne z  $M$ , to sieć jest odwracalna.

Wśród własności strukturalnych sieci Petriego do najistotniejszych należą:

- **Zwyczajność sieci** (ang. *ordinary*) – oznacza takie sieci Petriego, których wszystkie łuki mają wagę równą jeden.
- **Jednorodność sieci** (ang. *homogenous*) – to takie sieci Petriego, w których wagi łuków wyjściowych dla każdego miejsca są takie same.
- **Czystość sieci** (ang. *pure*) – oznacza sieci, które nie mają łuków odczytu.
- **Styczna bezkonfliktowość sieci** (ang. *statically conflict-free*) – dotyczy takich sieci Petriego, w których nie istnieją dwie różne tranzycje mające takie samo miejsce wejściowe. Jeśli dwie tranzycje mają wspólne miejsca, nazywane są statycznie konfliktowymi.
- **Zachowawczość sieci** (ang. *conservative*) – dotyczy sieci Petriego, w których suma wag na wejściowych łukach każdej tranzycji jest równa sumie wag na łukach wyjściowych.

### 3.2.3. Niezmienniki miejsc i tranzycji oraz sposoby ich analizy

Reprezentacja graficzna sieci Petriego jest bardzo intuicyjna i pozwala dostrzec występujące w niej zależności oraz zrozumieć jej ogólną strukturę. Nie jest ona jednak odpowiednia do przeprowadzania analizy własności sieci. Do tego służy reprezentacja sieci Petriego w postaci macierzy incydencji i tę reprezentację należy uznać za podstawową. Macierz incydencji ma wymiar  $n \times m$ , gdzie  $n$  to liczba miejsc (wiersze macierzy), a  $m$  to liczba tranzycji (kolumny macierzy). Wartość elementu  $a_{ij}$  macierzy incydencji  $A$  oznacza zmianę liczby tokenów w miejscu  $p_i$  w wyniku uruchomienia tranzycji  $t_j$ . Przykładowo, jeżeli uruchomienie tranzycji  $t_5$  w sieci przedstawionej na rycinie 10 [79] spowoduje, że z miejsca  $p_2$  wypłyną trzy tokeny (które w tym przypadku przepłyną przez tranzycję  $t_5$ ), to wartość



**Rycina 10.** Przykładowa sieć Petriego z siedmioma miejscami ( $p_0 - p_6$ ) i dziewięcioma tranzycjami ( $t_0 - t_8$ ), na podstawie której została przedstawiona koncepcja macierzy incydencji [79].

elementu  $a_{25}$  będzie równa -3. Tak zdefiniowana macierz incydencji całkowicie określa strukturę sieci Petriego.

Dla sieci zaprezentowanej na rycinie 10. macierz incydencji ( $A$ ) jest następująca:

$$A = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & -1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Ponieważ macierz incydencji zawiera pełną informację o strukturze sieci Petriego, stanowi ona podstawę analizy wielu jej własności. Jedną z podstawowych metod takiej analizy, zwłaszcza sieci będących modelami systemów biologicznych, jest oparta na tzw. *niezmiennikach* sieci. Wyróżnia się dwa rodzaje takich niezmienników, tj. *p-niezmienniki* (niezmienniki miejsc) i *t-niezmienniki* (niezmienniki tranzycji).

*p-niezmiennik* (ang. *p-invariant*) [214, 263, 264] jest wektorem  $y$  spełniającym następujące równanie:

$$y \bullet A = 0$$

Z kolei *t-niezmiennik* (ang. *t-invariant*) jest wektorem  $x$  spełniającym równanie:

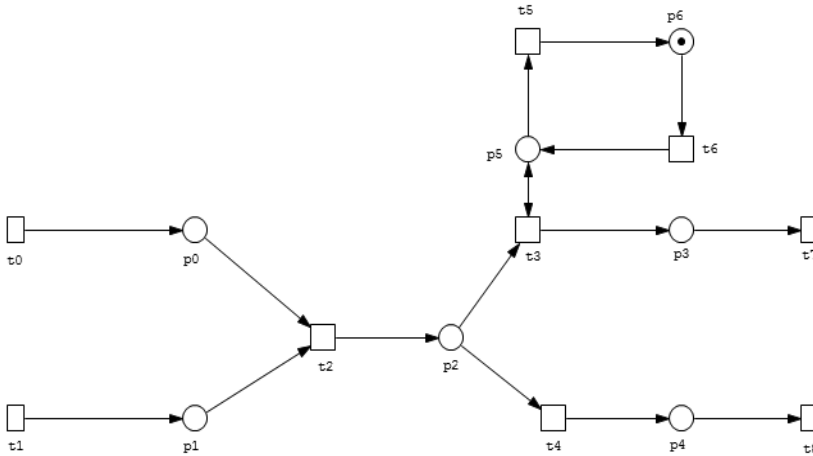
$$A \bullet x = 0$$

*p-niezmiennik* jest minimalnym *p-niezmiennikiem*, jeżeli nie zawiera innego *p-niezmiennika*. Podobnie, *t-niezmiennik* jest minimalnym *t-niezmiennikiem*, jeżeli nie zawiera innego *t-niezmiennika*. Ponieważ każdy niezmiennik sieci można uzyskać jako liniową kombinację odpowiednich minimalnych niezmienników, analizując własności sieci można (i należy) ograniczyć się do analizy minimalnych niezmienników.

*p-niezmiennik* odpowiada zbiorowi miejsc, w których ważona suma tokenów jest stała (wagi te odpowiadają elementom wektora będącego *p-niezmiennikiem*). Natomiast *t-niezmiennik* odpowiada zbiorowi tranzycji, których uruchomienie odpowiednią liczbę razy (równa wartościom odpowiednich elementów wektora, który jest niezmiennikiem) nie zmienia oznakowania sieci.

Kolejno, na rycinach 10a–10e zaprezentowano koncepcję *t-niezmienników* i wykonywalnych *t-niezmienników*.

Sieć przedstawiona na rycinie 10a różni się od sieci pokazanej na rycinie 10. połączeniem pomiędzy miejscem  $p_5$  i tranzycją  $t_3$  oraz obecnością znacznika znajdującego się w miejscu  $p_6$ . Na rycinie 10a miejsce  $p_5$  jest połączone z tranzycją  $t_3$  tzw. *łukiem odczytu*, który odpowiada dwóm przeciwnie skierowanym (zwykłym) łukom. Oznacza to, że do uruchomienia tranzycji  $t_3$  potrzebny jest token w miejscu  $p_5$ , ale w wyniku uruchomienia tej tranzycji token ten wypływa z  $p_5$  i poprzez  $t_3$  wraca z powrotem do  $t_5$ . A zatem w wyniku uruchomienia tranzycji  $t_3$  zmiana liczby tokenów w miejscu  $p_5$  jest równa zero i taka też jest wartość elementu  $a_{53}$  w macierzy incydencji. Oznacza to, że łuk odczytu łączący  $p_5$  z  $t_3$  nie jest w tej macierzy odzwierciedlony. Zjawisko to jest niewątpliwie przyczyną pewnych komplikacji, które pojawiają się podczas analizy t-nieziemienników, jeżeli w sieci znajdują się łuki odczytu.



**Rycina 10a.** Przykładowa sieć Petriego z siedmioma miejscami ( $p_0 - p_6$ ), dziewięcioma tranzycjami ( $t_0 - t_8$ ) [79].

Macierz incydencji ( $A$ ) dla sieci zaprezentowanej na rycinie 10a jest następująca:

$$A = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Dla tej sieci istnieje jeden minimalny  $p$ -niezmiennik  $y_1=[0,0,0,0,0,1,1]$  odpowiadający miejscom  $p_5$  i  $p_6$ . Oznacza to, że token znajdujący się początkowo w miejscu  $p_6$  będzie krążył pomiędzy tymi dwoma miejscami.

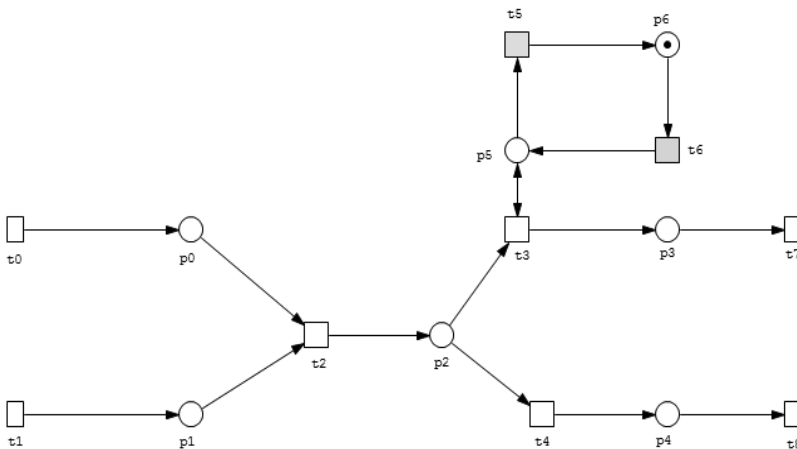
Aby fragment sieci, który odpowiada danemu  $p$ -niezmiennikowi miał wpływ na działanie całej sieci, odpowiednia liczba tokenów (w tym przypadku jeden) musi być umieszczona w którymś z miejsc odpowiadających temu niezmiennikowi w oznakowaniu początkowym, co wynika z definicji  $p$ -niezmiennika. Gdyby w oznakowaniu początkowym miejsca odpowiadające danemu  $p$ -niezmiennikowi nie zawierały żadnych tokenów, to sytuacja ta nigdy by się nie zmieniła, bo ważona suma tokenów w tych miejscach jest stała, czyli byłaby cały czas równa zero. W takiej sytuacji ten fragment sieci „nie działałby”.

Jeśli chodzi o  $t$ -niezmienniki występujące w sieci przedstawionej na rycinie 10a, to istnieją trzy takie niezmienniki, tj.:

$$\begin{aligned} x_1 &= [0,0,0,0,0,1,1,0,0] \\ x_2 &= [1,1,1,1,0,0,0,1,0] \\ x_3 &= [1,1,1,0,1,0,0,0,1] \end{aligned}$$

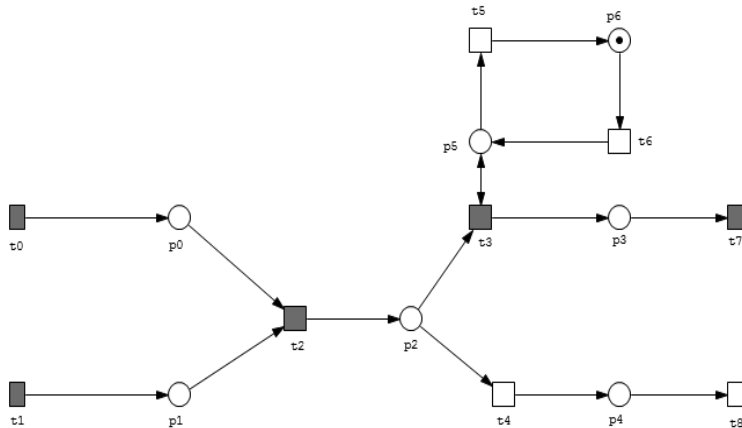
Niezmiennik  $x_1$  odpowiada tranzycjom  $t_5$  i  $t_6$  i reprezentuje on krążenie tokenu w  $p$ -niezmienniku  $y_1$ . Niezmiennik  $x_2$  odpowiada tranzycjom  $t_0, t_1, t_2, t_3$  i  $t_7$ , a niezmiennik  $x_3$  odpowiada tranzycjom  $t_0, t_1, t_2, t_4$  i  $t_8$ .  $t$ -niezmienniki sieci zaprezentowanej na rycinie 10a pokazano kolejno na rycinach 10b, 10c i 10d.

W przypadku sieci Petriego zawierających łuki odczytu pojawia się konieczność rozróżnienia minimalnych  $t$ -niezmienników na wykonywalne (ang. *feasible invariants*) i niewykonywalne (ang. *infeasible invariants*). Wykonywalny niezmiennik to taki minimalny  $t$ -niezmiennik, którego wszystkie tranzycje mogą

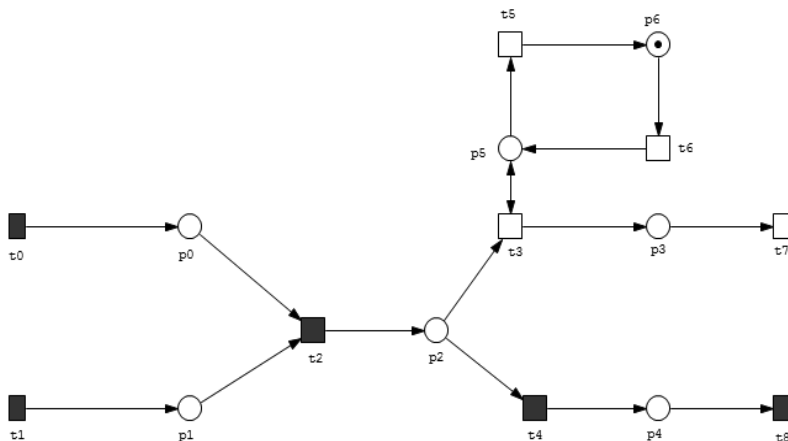


**Rycina 10b.** Przykładowa sieć Petriego z siedmioma miejscami ( $p_0$ – $p_6$ ), dziewięcioma tranzycjami ( $t_0$ – $t_8$ ) z wyróżnionym  $t$ -niezmiennikiem  $x_1$ .





**Rycina 10c.** Przykładowa sieć Petriego z siedmioma miejscami ( $p_0-p_6$ ), dziewięcioma tranzycjami ( $t_0-t_8$ ) z wyróżnionym  $t$ -niezmiennikiem  $x_2$ .



**Rycina 10d.** Przykładowa sieć Petriego z siedmioma miejscami ( $p_0-p_6$ ), dziewięcioma tranzycjami ( $t_0-t_8$ ) z wyróżnionym  $t$ -niezmiennikiem  $x_3$ .

zostać uruchomione bez uruchomienia jakiegokolwiek tranzycji nienależącej do tego niezmiennika.

Niezmiennik  $x_2$  nie jest wykonywalny, ponieważ do uruchomienia tranzycji  $t_3$  należącej do tego niezmiennika konieczne jest uruchomienie tranzycji  $t_6$ , która do niego nie należy. Uruchomienie  $t_6$  jest konieczne, bo spowoduje ono pojawienie się tokenu w miejscu  $p_5$ , który jest potrzebny do uruchomienia  $t_3$ . Z kolei, żeby  $t_6$  mogła zostać uruchomiona, w miejscu  $p_6$  musi znajdować się token. W sieci znajduje się on w tym miejscu w oznakowaniu początkowym, ale po pierwszym uruchomieniu tranzycji  $t_6$  znajdzie się on tam ponownie (i umożliwi ponowne uruchomienie tranzycji  $t_6$ ) tylko wtedy, gdy zostanie uruchomiona tranzycja  $t_5$ . A zatem do uruchomienia tranzycji  $t_3$  należącej do minimalnego  $t$ -niezmiennika

$x_2$  konieczne jest (w ogólności) uruchomienie tranzycji  $t_5$  i  $t_6$ , które do tego niezmiennika nie należą.

Metoda wyznaczania minimalnych  $t$ -niezmienników nie uwzględniła powyżej opisanej sytuacji, ponieważ opiera się ona na macierzy incydencji, a w macierzy tej nie ma informacji na temat łuku łączącego  $p_5$  z  $t_3$ , a więc także brakuje w niej informacji o powyżej opisanych zależnościach (tzn. o zależności  $t_3$  od tranzycji, które nie należą do  $x_2$ ).

W celu wyznaczenia z niewykonywalnego  $t$ -niezmiennika wykonywalnego  $t$ -niezmiennika należy go połączyć z minimalnymi  $t$ -niezmiennikami, które „dostarczają” tokeny niezbędne do uruchomienia tranzycji należących do tego niezmiennika. W przypadku  $x_2$  należy go połączyć z  $x_1$ , który odpowiada tranzycjom  $t_5$  i  $t_6$ . Uzyskuje się w ten sposób, pokazany na rycinie 10e, następujący wykonywalny  $t$ -niezmiennik ( $x_2'$ ):

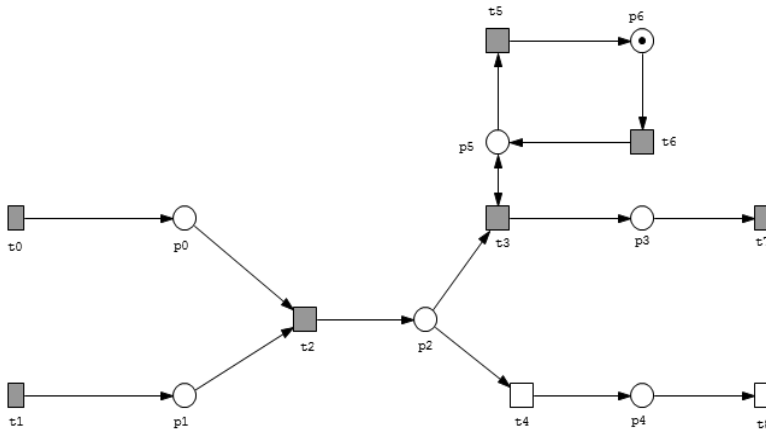
$$x_2' = [1, 1, 1, 1, 0, 1, 1, 1, 0]$$

odpowiadający tranzycjom  $t_0, t_1, t_2, t_3, t_5, t_6, t_7$ .

Natomiast pozostałe dwa minimalne  $t$ -niezmienniki, czyli  $x_1$  i  $x_3$  są wykonywalne, ponieważ do uruchomienia należących do nich tranzycji nie jest konieczne uruchomienie żadnych tranzycji, które do nich nie należą.

Sieć Petriego powinna być w całości pokryta przez  $t$ -niezmienniki, ponieważ tranzycja, która nie należy do żadnego  $t$ -niezmiennika nie ma wpływu na zachowanie sieci i może zostać usunięta. Dlatego przed przystąpieniem do dalszej analizy sieci należy usunąć niezmienniki, które nie mają żadnego znaczenia.

W przypadku sieci, które są modelami systemów biologicznych  $t$ -niezmienniki mogą być interpretowane jako podstawowe ścieżki i powinno być możliwe przypisanie im znaczenia biologicznego. Dodatkowo, tranzycje należące do



**Rycina 10e.** Przykładowa sieć Petriego z siedzioma miejscami ( $p_0 - p_6$ ), dziewięcioma tranzycjami ( $t_0 - t_8$ ) z wyróżnionym wykonywalnym  $t$ -niezmiennikiem  $x_2'$ .

$t$ -niezmiennika oraz miejsca znajdujące się pomiędzy nimi tworzą podsić, z którą powinna się wiązać jakaś biologiczna funkcja. Szczególnie istotne są opisane uprzednio minimalne  $t$ -niezmienniki, gdyż odpowiadają one pewnym elementarnym funkcjom biologicznym.

Analiza własności systemu biologicznego modelowanego za pomocą sieci Petriego polega przede wszystkim na analizie wykonywalnych niezmienników. Innymi słowy, każdemu niezmiennikowi trzeba przypisać określone biologiczne znaczenie. Może to jednak nie być takie proste, gdyż procesy biologiczne są bardzo złożone i z reguły liczba  $t$ -niezmienników jest bardzo duża. W takiej sytuacji zamiast analizować pojedynczo wszystkie niezmienniki proponuje się analizę zbiorów, które występują dokładnie w tych samych wykonywalnych  $t$ -niezmiennikach. Wówczas znaczenie biologiczne przypisuje się uzyskanym w ten sposób zbiorom zamiast nadawania go po kolei wszystkim tranzycjom występującym w sieci. Takie zbiory tranzycji nazywa się *zbiorami MCT* (ang. *maximal common transitions sets*). Obliczanie zbiorów MCT (algorytm do ich obliczania znajduje się w [266]) stanowi kolejny etap analizy sieci Petriego. Zbiory MCT pod względem biologicznym odpowiadają podziałowi modelowanego procesu na mniejsze bloki, którym można przypisać znaczenie biologiczne. Jednak przypisanie takiego znaczenia może się okazać w niektórych przypadkach trudne, na przykład, gdy w wyniku przeprowadzonej analizy uzyskamy zbiory MCT zawierające jedynie jedną tranzycję. W związku z tym zazwyczaj pod uwagę bierze się jedynie te zbiory MCT, które zawierają więcej niż jedną tranzycję. Ponadto należy zauważyć, że zbiory MCT wcale nie muszą odpowiadać zwartym fragmentom sieci, czyli zbiorom tranzycji połączonych ze sobą w sposób bezpośredni za pośrednictwem miejsc, co z kolei już na tym etapie analizy może dawać wartościowe wyniki. Mianowicie do zbiorów MCT mogą zostać zakwalifikowane tranzycje, które wydawały się na etapie tworzenia sieci nie być ze sobą powiązane. Może się zatem okazać, że dany proces/podproces wymaga substancji/cząsteczek o których udziale do tej pory nie wiedzieliśmy.

Kolejną metodą analizy  $t$ -niezmienników wykorzystywaną szczególnie w przypadku otrzymania dużej liczby  $t$ -niezmienników jest połączenie ich w grupy określane mianem *klastrów* (*skupień*). Obiekty należące do danego skupienia powinny być jak najbardziej podobne do siebie, a obiekty należące do różnych skupień powinny być z kolei możliwie mocno do siebie niepodobne. Głównym celem tej analizy jest wykrycie w zbiorze danych, tzw. naturalnych skupień, czyli klastrów, które dają się w sensowny sposób interpretować.

Istnieje wiele definicji klastra, co wynika w głównej mierze z różnorodności dziedzin, w których stosuje się takie metody grupowania danych. Według jednej z bardziej popularnych definicji klastry to zbiory obiektów, które są do siebie podobne, bez precyzowania pojęcia podobieństwa. Z kolei inna definicja określa mianem klastra zbiory obiektów takich, w których odległość pomiędzy dwoma dowolnymi obiektami należącymi do klastra jest mniejsza niż odległość występu-

jąca pomiędzy dowolnym obiektem należącym do klastra i dowolnym obiektem, który do takiego klastra nie należy [106].

W przypadku sieci Petriego, grupowanie (klastrowanie) oparte jest na podobieństwie niezmienników do siebie nawzajem. Na początku procesu grupowania trzeba zdecydować się na konkretną miarę odległości i metodę analiz, tj. metodę łączenia  $t$ -niezmienników w klastry, a następnie trzeba ustalić optymalną liczbę klastrow [208, 265]. Miara odległości określa sposób wyznaczania odległości pomiędzy grupowanymi elementami, stanowi miarę podobieństwa dwóch obiektów. Natomiast metoda pozwala dokonać podziału na klastry. Przy szczególnie dużej ilości niezmienników, kiedy niemożliwe staje się porównanie ze sobą wszystkich różnych klastrow wygenerowanych za pomocą różnych kombinacji miara  $x$  metoda, dokonuje się wyboru optymalnej liczby klastrow za pomocą *indeksu Calińskiego-Harabasz* [39] (indeks ten podaje ocenę dla każdej liczby klastrow w ramach kombinacji miara  $x$  metoda) oraz poprzez analizę wyników konturów (Tabela 2, Rycina 11). Kontur (zarys) podlega wizualizacji przy pomocy wykresu zarysu, w którym dobry podział to taki, który daje najdłuższe klastry o podobnej szerokości, a tzw. współczynnik zarysu (ang. *silhouette coefficient*,  $s_i$ ) mieści się w przedziale wartości od 0,71 do 1,00 (Tabela 2).

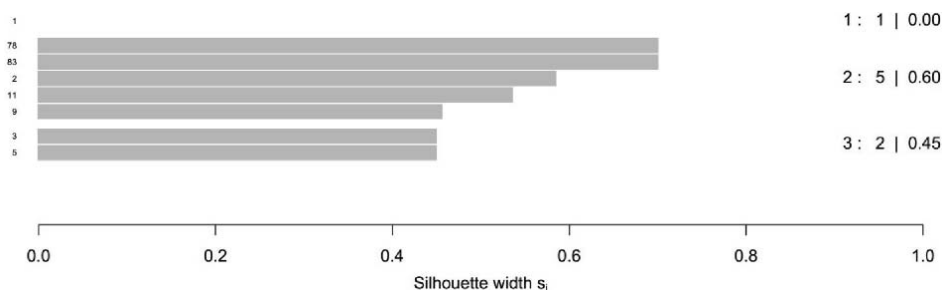
**Tabela 2.** Wartość współczynnika zarysu  $s_i$  i jego interpretacja

Wartość współczynnika zarysu ( $s_i$ )	Interpretacja
0,71–1,00	silna struktura
0,51–0,70	istotna struktura
0,26–0,50	słaba struktura
$\leq 0,25$	brak struktury

Średnia wartość zarysu  $s_i$  liczona jako średnia ważona dla każdego klastra (tj. suma odległości poszczególnych niezmienników w klastrze pomnożona przez liczbę niezmienników w danym klastrze i podzielona następnie przez liczbę wszystkich niezmienników) określa jak dobrze analizowane dane zostały przydzielone do danego klastra. Z tego względu średni zarys dla całego zbioru danych może służyć jako miara jakości podziału na klastry. Interpretacja średniej ważonej wartości zarysu  $s_i$  została przedstawiona w tabeli 2.

Przykład wizualizacji zarysu pokazano na rycinie 11. Widać na niej wyraźnie, że najlepszym jest podział na 2 klastry. Wtedy wartość współczynnika  $s_i$  jest równa 0,6, co oznacza istotną strukturę. W przypadku jednego klastra nie ma struktury, a podział na trzy klastry powoduje, że struktura jest słaba.

Ze względu na sposób przetwarzania danych, wyróżnia się wiele metod i algorytmów grupowania oraz wiele klasyfikacji algorytmów grupowania, spośród których najczęściej wykorzystywaną w analizach sieci Petriego jest analiza hierarchiczna.



**Rycina 11.** Przykładowy zarys przedstawiający trzy klastry, ze współczynnikami zarysu  $s_i$ , odpowiednio: 0, 0,6 oraz 0,45. Pierwszy klastrowany jest z pojedynczego  $t$ -niezmiennika, drugi zawiera ich pięć, a trzeci dwa.

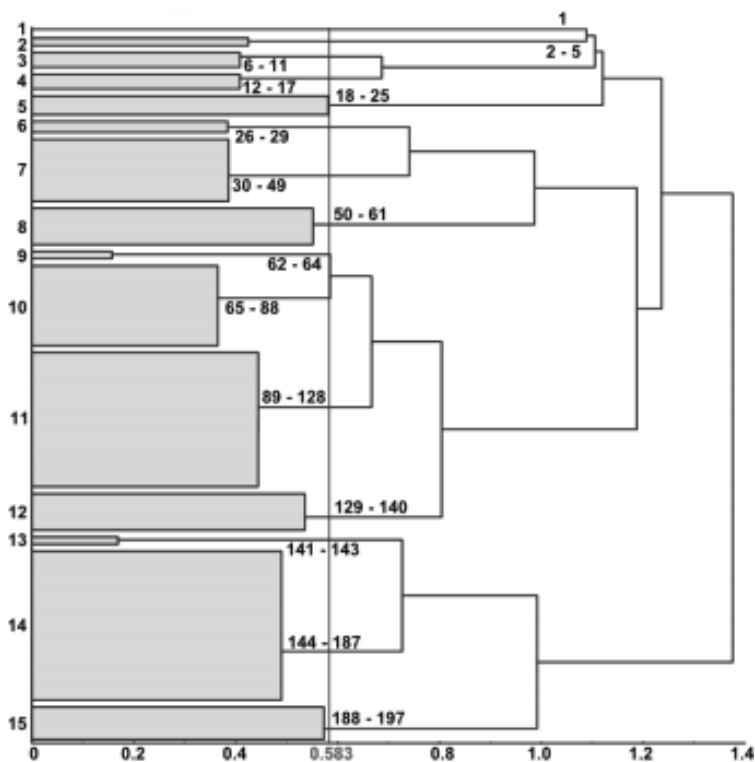
Metoda grupowania hierarchicznego polega na sekwencyjnym grupowaniu obiektów. Sekwencja operacji grupowania tworzy tak zwane drzewo klastrów (skupień), nazywane *diagramem drzewa* (*dendrogramem*). Liście takiego dendrogramu znajdują się na poziomie zerowym i reprezentują poszczególne obiekty, czyli  $t$ -niezmienniki, a węzły odpowiadające ich grupom występują na wysokości, która odpowiada miarze niepodobieństwa pomiędzy skupieniami reprezentowanymi przez węzły [106]. Graficznie, na dendrogramie, warunek stopu (tj. zadana liczba klastrów) przedstawia linia pionowa przecinająca dendrogram.

Na rycinie 12. przedstawiono przykładowy wynik klastrowania procesu, w którym uzyskano 15 klastrów, wraz z wyliczonym współczynnikiem odcięcia [77] równym w tym przypadku 0,583.

Dodatkowo, w ramach metod hierarchicznych, w zależności od sposobu konstruowania hierarchii wyodrębnia się dwie metody, tj. aglomeracyjne i deglomeracyjne. W przypadku analizy sieci Petriego stosowane są najczęściej metody aglomeracyjne, w których początkowo każdy element jest traktowany jako odrębna klasa. Następnie, te klasy łączy się stopniowo, aż do momentu, w którym wszystkie obiekty utworzą jeden zbiór. Wspomniane metody deglomeracyjne są oparte na procesie niejako odwrotnym do powyższego. Rozpoczyna się w nich od pojedynczego zbioru, zawierającego wszystkie obiekty, a następnie dokonuje się jego sekwencyjnego podziału.

W celu dokonania analizy skupień można skorzystać ze standardowych algorytmów do grupowania. Takim algorytmem jest np. algorytm UPGMA (ang. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), opierający się na metodzie średnich połączeń, w którym w każdym kroku łączone są ze sobą dwa najbliższe obiekty. W przypadku sieci Petriego te dwa najbliższe obiekty to niezmienniki  $i$ / lub utworzone wcześniej  $t$ -klastry. Procedura tworzenia  $t$ -klastrów w tym algorytmie zatrzymuje się w momencie uzyskania jednego  $t$ -klastra, w którym znajdują się wszystkie  $t$ -niezmienniki. Jednak klastrowanie takie, jeśli chodzi o analizę nie jest interesujące, dlatego jak już poprzednio wspomniano, trzeba w nim dokonać

„odcięcia” na wybranym poziomie dendrogramu. „Odcięcia” takiego dokonuje się przy pomocy różnych metod, m.in. w oparciu o wielkość współczynnika odcięcia (Rycina 11), indeks Calińskiego-Harabasa lub za pomocą współczynnika zarysu  $s_i$  (Tabela 2, Rycina 11).



**Rycina 12.** Przykładowy dendrogram przedstawiający podział modelowanego zjawiska na piętnaście podprocesów z jednoczesnym zaznaczeniem 197  $t$ -niezmienników, współczynnik odcięcia dla danego podziału jest równy 0,583.

## 4. Cele pracy

Pierwszy cel główny: *Analiza molekularnych podstaw powstawania miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek.*

Cele szczegółowe:

1. Ocena stopnia nasilenia stanu zapalnego u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek.
2. Ocena stopnia nasilenia stresu oksydacyjnego u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek.
3. Porównanie stopnia nasilenia stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w grupach pacjentów z przewlekłą chorobą nerek i pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym w wywiadzie, lecz bez jawnej klinicznie i laboratoryjnie choroby nerek.
4. Ocena akumulacji wybranych białek osocza u chorych w różnych stadiach przewlekłej choroby nerek.
5. Analiza porównawcza proteomów pacjentów w różnych stadiach przewlekłej choroby nerek i proteomów chorych z ostrym zespołem wieńcowym w wywiadzie, lecz bez jawnej klinicznie i laboratoryjnie choroby nerek.

Drugi cel główny: *Stworzenie, w oparciu o sieci Petriego, wybranych formalnych modeli, które precyzyjnie odzwierciedlałyby procesy leżące u podłoża miażdżycy.*

Cele szczegółowe:

1. Stworzenie i analiza modelu przedstawiającego obraz dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w przebiegu miażdżycy.
2. Stworzenie i analiza modelu opisującego zjawisko stresu oksydacyjnego uczestniczącego w procesie miażdżycy.

## 5. Materiał i metody

### 5.1. Charakterystyka badanej populacji

Główne badanie zostało poprzedzone badaniami wstępnymi proteomu, do których zakwalifikowano cztery osoby. Osoby te zostały dobrane w ten sposób aby były jak najbardziej reprezentatywne dla grup z których się wywodziły, tj. grupy chorych z wczesną postacią choroby nerek, grupy pacjentów hemodializowanych, pacjentów z ostrą chorobą wieńcową w wywiadzie, lecz bez jawnej klinicznie i laboratoryjnie choroby nerek, oraz zdrowych ochotników. Początkowo nie zamierzano badać osób w stadium 3 lub 4 PChN wg KDOQ, stąd brak grupy CKD3-4 w badaniach wstępnych. Charakterystyka osób zakwalifikowanych do wstępnych badań proteomicznych została przedstawiona w tabeli 3.

Do głównego badania zakwalifikowano 125 osób pochodzenia kaukaskiego, które włączono do pięciu grup o równej liczebności, tj. po 25 osób każda. Grupy osób biorących udział w badaniu zostały przedstawione na rycinie 13.

Główną grupę badanych (n = 75) stanowili chorzy z przewlekłą chorobą nerek, leczeni w Oddziale Klinicznym Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Szpitala Klinicznego nr 2 im. Heliodora Święcickiego w Poznaniu i/lub będący pod opieką Poradni Nefrologicznej tego szpitala. Chorzy ci na podstawie stopnia upośledzenia funkcji nerek, ocenianego na podstawie oszacowanej wielkości przesączania kłębuszkowego (ang. *estimated glomerular filtration rate*, eGFR) określającego prędkość powstawania ultrafiltratu w kłębuszkach nerkowych, zostali zakwalifikowani do jednej z trzech grup, tj. CKD1-2, CKD3-4 i CKD5.

Kryteria zakwalifikowania chorych z rozpoznaniem PChN do poszczególnych grup na podstawie oszacowanej **wielkości eGFR** przedstawiono w tabeli 4. Przedział wartości granicznych eGFR dla badanych grup został dobrany w oparciu o kryteria ustalone przez grupę *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (K/DOQI) dla poszczególnych stadiów zaawansowania PChN. Funkcję nerek oceniano u wszystkich badanych osób na podstawie skróconego równania MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*):

$$\text{eGFR [ml/min/1,73 m}^2\text{]} = 186,3 \cdot P_{\text{kr}}^{-1,154} \cdot \text{wiek}^{-0,203}$$

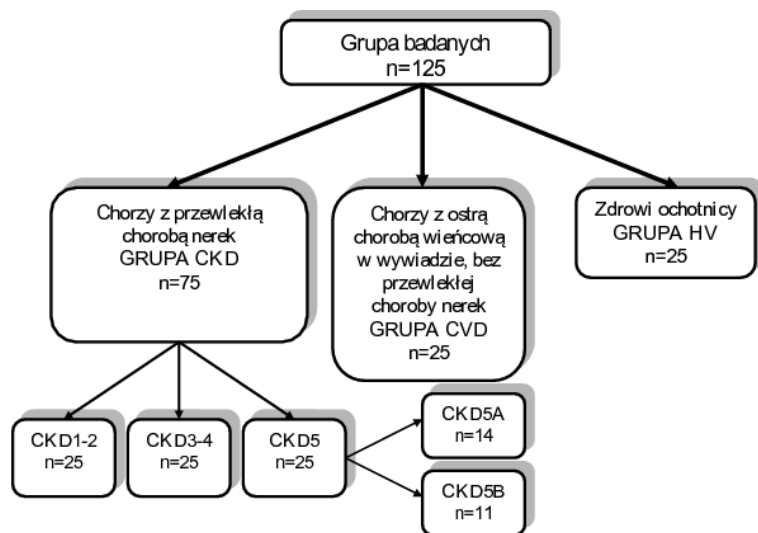
(u kobiet wynik mnożono przez 0,742, gdzie  $P_{\text{kr}}$  oznacza wielkość stężenia kreatyniny [mg/dl] w surowicy krwi [178]). Korzystanie z tego wzoru jest zalecane w Polsce, zgodnie ze wspólnym stanowiskiem zespołu konsultanta krajowego w dziedzinie nefrologii oraz zarządu głównego Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego [258].



**Tabela 3.** Charakterystyka osób zakwalifikowanych do wstępnych badań proteomicznych

Zmienna	Grupa HV	Grupa CVD	Grupa CKD1-2	Grupa CKD5	
wiek [lata]	31	46	58	56	
płeć	M	M	M	M	
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	20	28	30	22	
palenie papierosów	–	–	–	–	
wywiad	zdrowy ochotnik	<ul style="list-style-type: none"> <li>– stan po zawale serca (06.2006)</li> <li>– stan po koronaroplastyce prawej tętnicy wieńcowej (PTW)</li> <li>– nadciśnienie tętnicze</li> <li>– aktualna koronarografia: istotne i graniczne zwężenia gałęzi przedniej zstępującej, krytyczne zwężenie recesywnej gałęzi okalającej, bez restenozy w prawej tętnicy wieńcowej</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– stadium I przewlekłej choroby nerek</li> <li>– choroba niedokrwienna serca</li> <li>– nadciśnienie tętnicze (zmiany II° na dnie oka)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– schyłkowa niewydolność nerek (stadium V przewlekłej choroby nerek)</li> <li>– leczenie przewlekłą powtarzaną hemodializą od 5 lat</li> <li>– niestabilna choroba wieńcowa od 5 lat</li> </ul>	
leki przyjmowane na stałe	–	nitrogliceryna, statyna (40 mg), kwas acetylosalicylowy, β-bloker, ACEI	statyna (20 mg), kwas acetylosalicylowy, diuretyk pętlowy	statyna (20 mg), ACEI	
surowica	kreatynina [mg/dl]	0,65	0,9	1,0	6,25
	eGFR [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	152,53	96,67	81,70	9,93
	białko całk. [g/dl]	8,2	7,2	4,9	6,8
	całkowity cholesterol [mg/dl]	189	186	328	204
	HDL cholesterol [mg/dl]	76	34	33	41
	LDL cholesterol [mg/dl]	105	122	249	142
	triglicerydy [mg/dl]	38	148	243	109
	glukoza [mg/dl]	94	87	69	78
mocz	białko [g/dobę]	ujemne	ujemne	1,5	–

Podczas klasyfikowania chorych z PChN do poszczególnych grup opierano się wyłącznie na oszacowanej wielkości eGFR i nie brano pod uwagę wielkości utraty białka z moczem. Utrata ta powinna być dziś, zgodnie z wytycznymi zespołu nefrologów amerykańskich wchodzących w skład KDOQI (<http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines>) zaakceptowanych przez międzynarodowe gremium *Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO)* ([http://www.kdigo.org/clinical\\_practice\\_guidelines/ckd.php](http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/ckd.php)), uwzględniana w celu prawidłowego zdiagnozowania chorego z PChN i prawidłowej stratyfikacji jego ryzyka sercowo-naczyniowego. W obecnym badaniu nie brano pod uwagę wielkości utraty białka



Rycina 13. Grupy osób zakwalifikowanych do badania.

Tabela 4. Kryteria zakwalifikowania chorych z PChN do poszczególnych grup badawczych na podstawie oszacowanej wielkości GFR (eGFR)

Stadium PChN wg KDOQI [178]	eGFR [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	Chorzy z PChN zakwalifikowani do badania	
		nazwa grupy	eGFR* [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]
1	≥ 90	CKD1-2	96,98 ± 21,0
2	60–89		
3	30–59	CKD3-4	28,73 ± 13,2
4	15–29		
5	< 15 lub dializa	CKD5	6,8 ± 7,73

\* Wielkość GFR oszacowana dla chorych z PChN zakwalifikowanych do badania przedstawiona jako średnia wartość ± SD.

z moczem, ponieważ w czasie włączania chorych do badania nie było wytycznych amerykańskich KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease [144].

Do pierwszej grupy (CKD1-2) włączono 25 chorych, z wczesną postacią PChN, charakteryzujących się wielkością eGFR mieszczącą się w przedziale od 90 ml/min/1,73m<sup>2</sup> do 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, zgodnie z KDOQI [178] byli to chorzy w 1 i 2 stadium PChN.

W drugiej grupie (CKD3-4) znalazło się 25 pacjentów z bardziej zaawansowaną postacią PChN, u których wielkość eGFR wahała się pomiędzy 59 ml/min/1,73m<sup>2</sup> a 15 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Wg zaleceń K/DOQI [179] byli to chorzy w 3 i 4 stadium PChN.

Do trzeciej grupy (CKD5) zakwalifikowano 25 chorych w stadium schyłkowej niewydolności nerek leczonych przewlekłą powtarzaną hemodializą (ang. *hemo-*

dialysis, HD) przez co najmniej 8 miesięcy. Chorzy ci, w zależności od wystąpienia w ciągu 12-miesięcznej obserwacji zgonu będącego następstwem choroby sercowo-naczyniowej, byli kwalifikowani do jednej z dwóch grup, tj. CKD5A (osoby które przeżyły 12-miesięczny okres obserwacji) i CKD5B (osoby, które zmarły w następstwie choroby sercowo-naczyniowej w okresie 12 miesięcy od momentu rozpoczęcia badania). Wśród jedenastu zmarłych osób sześć miało udar niedokrwienny mózgu, cztery niewydolność serca, a jedna zawał mięśnia sercowego.

Wszyscy chorzy grupy CKD5 w momencie włączenia do badania byli leczeni przez okres  $39,86 \pm 32,03$  miesięcy (zakres 8–156 miesięcy) przewlekłą powtarzaną hemodializą (HD) w systemie trzy sesje HD w tygodniu, średnio po 4–5 godzin każda. Parametry dializy były ustalane w zależności od stanu chorego i wskaźnika adekwatności dializy. Średnia adekwatność hemodializy (Kt/V) wynosiła  $1,25 \pm 0,24$  (zakres 0,83–1,78). Przepływ krwi podczas hemodializy wahał się pomiędzy 180–280 ml/min, a przepływ płynu dializacyjnego wynosił średnio 500 ml/min. Dostęp naczyniowy u wszystkich chorych stanowiła przetoka tętniczko-żylna umieszczona na przedramieniu lub na ramieniu. Ultrafiltracja różniła się w zależności od aktualnej masy ciała pacjenta i przyboru masy ciała pomiędzy dializami. Wszyscy pacjenci byli dializowani za pomocą dializatorów polisulfonowych o niskim przepływie, tzw. *low-flux*. Większość badanych z grupy CKD5, z wyjątkiem dwóch osób, wymagała leczenia rekombinowaną ludzką erytropoetyną. U 19 osób stosowano erytropoetynę  $\alpha$  lub  $\beta$  w dawce średniej 6000 j/tydzień, a u 4 osób darbapoetynę (30  $\mu$ g/dwa tygodnie).

Pacjenci z PChN zakwalifikowani do badania mieli zdiagnozowaną przyczynę nefropatii przez lekarzy Oddziału Klinicznego Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Szpitala Klinicznego nr 2 im. Heliodora Święcickiego w Poznaniu. W przypadku braku przyczynowego rozpoznania PChN, ustalano je (w porozumieniu z lekarzami Oddziału) w oparciu o historię choroby, przeprowadzony wywiad z pacjentem i aktualne wyniki badań rutynowo wykorzystywanych w nefrologii.

U przeważającej większości chorych z PChN ( $n = 50$ ) zakwalifikowanych do badania rozpoznano nefropatię nadciśnieniową. Pomimo, że postępowanie diagnostyczne powinno uwzględniać biopsję nerki, była ona wykonana jedynie wśród 17 chorych, tylko wtedy gdy istniały wątpliwości diagnostyczne. W przypadkach tych wątpliwości uzyskano rozpoznanie nefropatii nadciśnieniowej na podstawie uwidocznionych w biopsji zmian o charakterze łagodnego stwardnienia naczyniowego (łac. *nephroangiosclerosis benigna*). Rzadkie wykonywanie biopsji w przypadku pacjentów z podejrzeniem klinicznym nefropatii nadciśnieniowej wynikało w głównej mierze z braku cech aktywnego osadu moczu oraz występowaniu jedynie nieznacznego białkomoczu w wywiadzie. W przypadku chorych, u których nie wykonano biopsji, wysunięcie podejrzenia nefropatii nadciśnieniowej opierało się na kryteriach klinicznych zapro-

nowanych przez Schlessingera [270]. Wspomniane kryteria obejmują: dodatni wywiad rodzinny w kierunku nadciśnienia tętniczego, obecność długotrwałego nadciśnienia tętniczego poprzedzającego pojawienie się objawów uszkodzenia nerek, ujawniony białkomocz, występowanie innych powikłań narządowych nadciśnienia (przerost mięśnia sercowego, retinopatia nadciśnieniowa), brak objawów sugerujących wrodzoną lub nabytą pierwotną chorobę nerek oraz chorobę układową z zajęciem nerek, oraz brak danych na temat ekspozycji na środki o działaniu nefrotoksycznym. U 33 badanych chorych rozpoznano nefropatię nadciśnieniową w oparciu o kryteria kliniczne [52, 261].

Nefropatię IgA rozpoznano u 21 chorych. Natomiast wśród czterech chorych występowało nadciśnienie tętnicze w wywiadzie, lecz na podstawie kryteriów klinicznych nie było pewności co do rozpoznania nefropatii nadciśnieniowej. W tabeli 5. przedstawiono przyczyny przewlekłej choroby nerek z uwzględnieniem podziału grupy CKD w zależności od stopnia upośledzenia funkcji nerek.

**Tabela 5.** Schorzenia leżące u podłoża przewlekłej choroby nerek pacjentów zakwalifikowanych do grup CKD

Przyczyny PChN	Liczba pacjentów		
	CKD1-2 (n = 25)	CKD3-4 (n = 25)	CKD5 (n = 25)
Nefropatia nadciśnieniowa	17	16	17
Przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek (w przebiegu nefropatii IgA)	8	7	6
Nadciśnienie tętnicze w wywiadzie, rozpoznanie odnośnie nefropatii nadciśnieniowej niepewne	0	2	2

*Dane przedstawione w postaci liczby osób, u których zdiagnozowano określoną przyczynę PChN.*

Grupę (CVD) utworzyło 25 chorych z ostrym zespołem wieńcowym w wywiadzie, bez jawnej klinicznie i laboratoryjnie choroby nerek. Chorzy ci byli przyjęci do Oddziału Klinicznego Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych Szpitala Klinicznego nr 2 im. Heliodora Świącickiego w Poznaniu w celu wykonania planowej koronarografii.

Natomiast do grupy kontrolnej włączono 25 zdrowych ochotników (HV), rekrutowanych wśród studentów oraz pracowników Szpitala Klinicznego nr 2 im. Heliodora Świącickiego w Poznaniu.

Wszystkie osoby biorące udział w badaniu zostały poinformowane o jego celu i wyraziły pisemną zgodę na jego przeprowadzenie. Program pracy przedstawiono w Komisji ds. Etyki i Badań Naukowych przy Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu i uzyskano akceptację na jej przeprowadzenie (decyzja nr 14/07, z dnia 4 stycznia 2007 r.). Wśród wszystkich badanych przeprowadzono wywiad lekarski, wykonano badanie przedmiotowe i zapoznano się z dostępną dokumentacją medyczną.

Przyjęto następujące kryteria kwalifikacji do badania:

**1. Ogólne zasady kwalifikacji do badania wspólne dla wszystkich badanych osób:**

- ukończony 18 rok życia,
- pisemne wyrażenie zgody na udział w badaniu,
- niepalenie papierosów od co najmniej 10 lat w wywiadzie,
- nienadużywanie alkoholu od co najmniej 10 lat w wywiadzie,
- brak cukrzycy oraz stanów przedcukrzycowych (tj. nieprawidłowej glikemii na czczo i/lub nieprawidłowej tolerancji glukozy),
- brak klinicznie aktywnego procesu zapalnego (osoby z objawami aktywnej infekcji bakteryjnej, wirusowej lub grzybiczej zostały wyłączone z badania),
- brak choroby nowotworowej w wywiadzie lub choroba nowotworowa, której leczenie zakończono co najmniej 10 lat temu,
- brak leczenia immunosupresyjnego w wywiadzie,
- stabilna funkcja wątroby (nie więcej niż dwukrotnie podwyższona aktywność transaminaz), antygen HBs i przeciwciała anti-HCV, anti-HIV ujemne,
- istnienie możliwości monitorowania osób zakwalifikowanych do badania przez okres jednego roku, w celu odnotowania w tym czasie wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego zakończonego zgonem.

**2. Dodatkowe zasady kwalifikacji do badania dla populacji chorych z PChN:**

- kontrolowane nadciśnienie tętnicze krwi w wywiadzie, definiowane jako ciśnienie tętnicze  $> 140/90$  mmHg lub pobieranie leków przeciwnadciśnieniowych,
- brak dodatkowych współistniejących chorób nie wynikających w sposób bezpośredni lub pośredni z przewlekłej choroby nerek,
- brak w momencie włączenia do badania ostrych powikłań sercowo-naczyniowych, tj. ostrej niewydolności krążenia, przełomu nadciśnieniowego, ostrego zespołu wieńcowego,
- utrata białka z moczem, o ile występuje nie powinna przekraczać 0,5 g/dobę. W przypadku chorych z grupy CKD5 dodatkowe kryteria kwalifikacji były następujące:
- minimum 8-miesięczny okres leczenia powtarzaną hemodializą, 3 razy w tygodniu przez minimum 4 godziny,
- minimalny wskaźnik adekwatności dializy  $Kt/V \geq 0,8$  (w badaniach *National Cooperative Dialysis Study*, wartość tego wskaźnika w modelu jednoprzeciwnym uznano za minimalną dawkę dializy, poniżej której znacznie wzrasta ryzyko niedodializowania i niepowodzenia terapii [93]),
- dostęp do naczyń – przetoka tętniczo-żylna.

**3. Dodatkowe zasady kwalifikacji do badania dla pacjentów grupy CVD:**

- brak klinicznie i laboratoryjnie jawnych cech upośledzenia funkcji nerek w wywiadzie oraz w chwili włączenia do badania,
- dusznica bolesna w wywiadzie,

- kontrolowane nadciśnienie tętnicze krwi w wywiadzie, definiowane jako ciśnienie tętnicze > 140/90 mmHg lub pobieranie leków przeciwnadciśnieniowych,
- udokumentowana obecność co najmniej jednego ostrego zespołu wieńcowego w wywiadzie (niestabilna dławica piersiowa lub zawał serca z uniesieniem odcinka ST (ang. *ST elevation myocardial infarction*, STEMI) lub zawał serca bez uniesienia odcinka ST (ang. *no ST elevation myocardial infarction*, NSTEMI)),
- przyjęcie do Oddziału Klinicznego Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych w celu wykonania planowej koronarografii,
- w dniu zakwalifikowania do badania bez cech ostrego zespołu wieńcowego,
- brak dodatkowych współistniejących chorób, czyli takich, które nie wynikają w sposób bezpośredni lub pośredni z choroby wieńcowej.

#### **4. Dodatkowe zasady kwalifikacji do badania dla populacji osób zdrowych:**

- prawidłowa funkcja nerek, oszacowana w oparciu o wielkość eGFR (eGFR > 90 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>),
- brak jakiegokolwiek choroby przewlekłej w wywiadzie,
- nieprzyjmowanie na stałe żadnych leków.

Wszyscy badani chorzy, poza wymogiem spełnienia kryteriów kwalifikacji ogólnych i dodatkowych, tj. obowiązujących dla poszczególnych grup, byli dobierani do grup w ten sposób, aby zminimalizować różnice pomiędzy grupami w zakresie wieku i płci, wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego, poziomów glikemii oraz w przypadku PChN – przyczyn nefropatii. Dodatkowo kwalifikowano pacjentów do grup tak, aby w miarę możliwości utworzyć jak najbardziej jednorodne grupy pod względem przyjmowanych leków i ich dawek. Jednak różnic w zakresie wszystkich przyjmowanych leków nie dało się w pełni uniknąć. Różnice, które potencjalnie mogły mieć wpływ na uzyskane wyniki dotyczyły przede wszystkim niesteroidowych leków przeciwzapalnych (kwas acetylosalicylowy 75 mg), klopidoogrelu, inhibitorów konwertazy angiotensyny (ang. *angiotensin-converting-enzyme inhibitor*, ACEI), kwasu foliowego oraz leków regulujących gospodarkę wapniowo-fosforanową. Wykaz leków wraz z liczbą osób przyjmujących regularnie dane leki z podziałem na poszczególne grupy chorych został przedstawiony w tabeli 6.

Ogólna charakterystyka osób zakwalifikowanych do badania została przedstawiona w tabeli 7. Uwzględniono w niej podstawowe informacje zebrane w czasie wywiadu z chorym lub jego rodziną, a także wyniki badań laboratoryjnych wykonanych w dniu włączenia do badania, obejmujące morfologię krwi, parametry gospodarki żelazowej (żelazo, ferrytyna), profil lipidowy (cholesterol całkowity, cholesterol frakcji LDL i HDL, triglicerydy (TAG)), profil wątrobowy (aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT), aminotransferazy asparaginianowej (AST) i bilirubiny), stężenie białka całkowitego, albumin i mocznika w surowicy krwi oraz wskaźniki gospodarki wapniowo-fosforanowej (wapń całkowity, fosforany, parathormon (iPTH)).

Dodatkowo zamieszczono w tabeli wyniki badania grubości kompleksu błony wewnętrznej i błony środkowej tętnicy szyjnej (ang. *intima-media thickness*, IMT).

**Tabela 6.** Wykaz leków uwzględniający liczbę osób przyjmujących dany lek

Grupa leków	Grupa pacjentów z PChN			
	CKD (n = 75)			CVD (n = 25)
	CKD1-2 (n = 25)	CKD3-4 (n = 25)	CKD5 (n = 25)	
inhibitory konwertazy angiotensyny (ACEI)	21 (84%)	12 (48%)	15 (60%)	19 (76%)
statyny 20 mg/40 mg/d	6/14 (84%)	9/12 (84%)	6/17 (92%)	2/23 (100%)
fibraty	6 (24%)	5 (20%)	3 (12%)	5 (20%)
diuretyki	11 (44%)	7 (28%)	8 (32%)	10 (40%)
kwas acetylosalicylowy 75mg/d	6 (24%)	8 (32%)	8 (32%)	25 (100%)
klopidogrel 75mg	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	25 (100%)
β-blokery	13 (52%)	20 (80%)	22 (88%)	22 (88%)
Ca-blokery	7 (28%)	8 (32%)	10 (40%)	2 (8%)
nitraty	1 (4%)	1 (4%)	3 (12%)	23 (92%)
glikozyd nasercowy, digoksyna	1 (4%)	5 (20%)	7 (28%)	0 (0%)
rHuEPO	0 (0%)	11 (44%)	23 (92%)	
żelazo	2 (8%)	3 (12%)	16 (64%)	
kwas foliowy 15 mg/tydz.	1 (4%)	5 (20%)	16 (64%)	
węglan wapnia	1 (4%)	8 (32%)	16 (64%)	
preparaty wiążące fosforany	0 (0%)	1 (12%)	13 (52%)	
witamina D3 (alfa-calcidiol 0,25 µg/d)	1 (4%)	0 (0%)	25 (100%)	
witamina B kompleks (2 tabl./d)	2 (8%)	6 (24%)	18 (72%)	
witamina C 100 mg/d	3 (12%)	3 (12%)	14 (56%)	

*Dane przedstawione w postaci liczby osób [n] regularnie przyjmujących lek z danej grupy leków, z uwzględnieniem procentowego udziału tych osób (%), w stosunku do pozostałych chorych z danej grupy, tj. tych, które w momencie włączenia do badania danego leku nie przyjmowały.*

Na podstawie informacji zawartych w tabelach 5, 6 i 7 można zauważyć, że najbardziej zbliżone do siebie pod względem analizowanych parametrów były grupy CKD1-2 i CVD. Pacjenci zakwalifikowani do tych grup charakteryzowali się podobnymi średnimi wielkościami BMI. Większość wykazywała nadwagę (BMI w zakresie 25,1–30,0 kg/m<sup>2</sup>), a u 6 osób w każdej z grup zdiagnozowano otyłość, którą rozpoznawano przy BMI powyżej 30 kg/m<sup>2</sup>. Ponadto, chorzy grup CKD1-2 i CVD nie wykazywali cech niedokrwistości ani zaburzeń w zakresie analizowanych parametrów gospodarki żelazowej. Stężenie mocznika w obu grupach było podobne i statystycznie istotnie niższe w porównaniu z grupami CKD3-4 i CKD5. Główne różnice pomiędzy tymi grupami odnotowano w zakresie gospodarki lipidowej. Pacjenci CKD1-2 charakteryzowali się wyższym stężeniem całkowitego cholesterolu, cholesterolu frakcji HDL i LDL, a także triglicerydów. Z kolei pacjenci grup CKD 3-4 i CKD5 cechowali się niedokrwistością, narastającymi zaburzeniami w gospodarce żelazowej i wapniowo-fosforanowej, narastającym poziomem mocznika w surowicy krwi. Profil lipidowy w grupach CKD3-4, CKD5 był zbliżony do tego obserwowanego w grupie HV, co prawdopodobnie było następstwem intensywnego leczenia statynami i/lub fibratami.

Tabela 7. Ogólna charakterystyka osób zakwalifikowanych do badania z podziałem na grupy

	Grupa pacjentów z PChN				HV (n = 25)	p*
	CKD (n = 75)			CVD (n = 25)		
	CKD 1-2 (n = 25)	CKD 3-4 (n = 25)	CKD5 (n = 25)			
wiek [lata]	60,1 ± 8,01	59,9 ± 8,4	60,1 ± 10,1	59,4 ± 9,08	59,5 ± 11,2	NS
kobiety/mężczyźni/ [n]	18/7	18/7	18/7	18/7	18/7	NS
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	28,19 ± 3,1	26,3 ± 2,01	24,7 ± 3,7	28,3 ± 3	24,6 ± 2,1	0,00
zawał serca i/lub udar mózgu w wywiadzie [n] (%)	4 (16%)	5 (20%)	14 (56%)	25 (100%)	0 (0%)	0,00
Podstawowe badania laboratoryjne						
HGB [g/dL]	13,31 ± 3,16	11,76 ± 1,57	11,41 ± 1,55	13,83 ± 1,22	14,02 ± 0,98	0,04
RBC [10 <sup>12</sup> /L]	4,65 ± 0,84	3,92 ± 0,66	3,69 ± 0,54	4,42 ± 0,68	4,71 ± 0,48	0,00
HCT [%]	43,02 ± 5,75	35,39 ± 4,45	32,27 ± 4,61	40,67 ± 3,87	44,07 ± 3,12	0,00
WBC [10 <sup>9</sup> /L]	7,38 ± 2,44	7,03 ± 1,96	6,08 ± 1,76	6,71 ± 1,63	5,43 ± 0,91	0,02
PLT [10 <sup>9</sup> /L]	205,71 ± 44,9	227 ± 81,8	179,35 ± 72,18	213,32 ± 41,93	316,73 ± 73,9	0,00
Fe [μmol/L]	89,2 ± 43,1	74,26 ± 27,65	76,33 ± 28,31	97,91 ± 42,43	113,45 ± 23,88	0,00
ferrytyna [ng/mL]	207,6 ± 111,4	301,74 ± 229,82	1084,92 ± 740,57	198 ± 131,7	209 ± 110,91	0,00
całkowity cholesterol [mg/dL]	217,06 ± 52,89	182,33 ± 29,69	179,53 ± 48,39	191,64 ± 41,22	188,73 ± 33,04	0,00
HDL cholesterol [mg/dL]	56,2 ± 11,79	58,4 ± 7,64	46,89 ± 23,076	43,62 ± 10,16	70,62 ± 6,32	0,00
LDL cholesterol [mg/dL]	168,66 ± 53,11	120,06 ± 17,11	105,97 ± 40,75	118,02 ± 31,66	93,96 ± 30,21	0,00
triglicerydy [mg/dL]	171,15 ± 70,1	116,66 ± 24,74	133,35 ± 50,83	149,96 ± 75,76	120,72 ± 37,1	NS
glukoza [mg/dL]	93,47 ± 9,52	91,85 ± 9,17	86,01 ± 10,51	97,2 ± 8,99	79,03 ± 10,13	0,00
albuminy [g/dL]	4,0 ± 0,96	4,13 ± 1,84	4,33 ± 0,68	4,33 ± 0,35	4,24 ± 0,67	NS
białko całkowite [g/dL]	6,6 ± 1,82	5,5 ± 1,23	6,63 ± 0,81	7,39 ± 0,38	7,21 ± 0,43	NS
mocznik [mg/dl]	30,75 ± 19,82	93,82 ± 46,75	121,74 ± 35,56	38,22 ± 11,89	27,45 ± 9,67	0,00
ALT [IU/L]	22,51 ± 12,52	16,75 ± 9,96	16,01 ± 7,81	23,39 ± 18,9	15,23 ± 6,37	NS
AST [IU/L]	19,72 ± 14,11	16,35 ± 8,54	15,29 ± 5,6	18,8 ± 9,73	16,05 ± 7,56	0,05
bilirubina [mg/dL]	0,76 ± 0,17	0,59 ± 0,82	0,53 ± 0,22	0,67 ± 0,15	0,49 ± 0,18	0,03
wapń całkowity [mg/dL]	6,08 ± 3,73	9,0 ± 0,45	9,66 ± 3,48	8,34 ± 0,1	8,55 ± 0,29	NS



cd. tabeli 7.

	Grupa pacjentów z PChN				HV (n = 25)	P*
	CKD (n = 75)			CVD (n = 25)		
	CKD 1-2 (n = 25)	CKD 3-4 (n = 25)	CKD5 (n = 25)			
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [mg/dL]	3,68 ± 1,81	3,74 ± 1,52	7,01 ± 3,56	3,6 ± 0,3	3,51 ± 0,7	0,00
iPTH [pg/mL]	209,34 ± 101,23	227,99 ± 184,709	320,81 ± 207,39	42,82 ± 10,2	40,23 ± 8,27	0,00
grubość blaszki miażdżycowej (IMT)	0,70 ± 0,15	0,80 ± 0,20	0,90 ± 0,36	0,74 ± 0,19	0,39 ± 0,16	0,000

\*Analizy porównawcze w odniesieniu do zmiennych ilościowych pomiędzy grupami wykonano przy użyciu testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa. Natomiast analizy porównawcze w zakresie zmiennych jakościowych zostały przeprowadzone przy użyciu testu  $\chi^2$ . Wyróżniono wartość P, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; NS – oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie analizowanego parametru.

Po 12 miesiącach od rozpoczęcia badania dokonano analizy pod kątem wystąpienia zgonów sercowo-naczyniowych w badanych grupach. Zgony z przyczyn sercowo-naczyniowych odnotowano tylko w grupie CKD5, w której po roku dokonano podziału na dwie podgrupy, tj. CKD5A i CKD5B. Charakterystyka grupy CKD5A została przedstawiona w tabeli 8. Na podstawie analizy danych i wyników w niej przedstawionych można zauważyć, że w zakresie podstawowych parametrów, grupy CKD5A i CKD5B różniły się istotnie statystycznie grubością blaszki miażdżycowej i ilością płytek krwi.

**Tabela 8.** Charakterystyka grupy CKD5 uwzględniająca podział na dwie podgrupy, w zależności od 12-miesięcznego przeżycia ocenianego od momentu włączenia do badania

Zmienna	CKD5 n = 25		
	CKD5A n = 14	CKD5B n = 11	P*
Dane antropometryczne			
wiek [lata]	56,17 ± 14,47	61,45 ± 5,8	NS
kobiety/mężczyźni [n]	9/5	7/4	NS
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	23,97 ± 3,69	25,94 ± 3,63	NS
Przyczyny PChN			
nefropatia nadciśnieniowa	9	8	NS
przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek (w przebiegu nefropatii IgA)	4	2	NS
nadciśnienie tętnicze w wywiadzie, rozpoznanie co do nefropatii nadciśnieniowej niepewne	1	1	NS

cd. tabeli 8.

Zmienna	CKD5 n = 25		
	CKD5A n = 14	CKD5B n = 11	P*
Parametry związane z leczeniem HD			
czas trwania schyłkowej niewydolności nerek przed rozpoczęciem leczenia HD [miesiące]	17,1 ± 2,4	18,3 ± 2,1	NS
czas leczenia HD [miesiące]	30,5 ± 34,19	33,5 ± 33,05	NS
Kt/V	1,23 ± 0,29	1,26 ± 0,25	NS
Czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego			
zawał mięśnia sercowego lub udar mózgu w wywiadzie [n] (%)	4 (28,57%)	3 (27,3)	NS
Regularnie przyjmowane leki			
ACEI	8 (57%)	7 (63,6%)	NS
statyny 20 mg/40 mg/d	3/5 (57%)	3/6 (63,6%)	NS
fibraty	2 (18,2%)	1 (7%)	NS
diuretyki	5 (35,7%)	3 (27,3%)	NS
kwas acetylosalicylowy 75 mg/d	4 (28,5%)	4 (36,4%)	NS
β-blokery	12 (85,7%)	10 (90,9%)	NS
Ca-blokery	6 (42,8%)	4 (36,4%)	NS
nitraty	1 (7%)	2 (18,2%)	NS
α-blokery	8 (57%)	5 (45,45%)	NS
glikozyd nasercowy, digoksyna	2 (14,3%)	5 (45,45%)	NS
rHuEPO	13 (92,8%)	10 (90,9%)	NS
żelazo	10 (71,4%)	6 (54,5%)	NS
kwas foliowy 15 mg/tydz	9 (14,3%)	7 (63,6%)	NS
węglan wapnia	12 (85,7%)	4 (36,36%)	NS
preparaty wiążące fosforany	6 (57%)	7 (63,6%)	NS
witamina D3 (alfa-calcidiol 0,25 µg/d)	14 (100%)	11 (100%)	NS
witamina B kompleks (2 tabl./d)	10 (71,4%)	8 (72,7%)	NS
witamina C 100 mg	8 (57,1%)	6 (54,5%)	NS
Wyniki podstawowych badań laboratoryjnych			
HGB [g/dL]	11,3 ± 1,26	11,57 ± 1,98	NS
RBC [10 <sup>12</sup> /L]	3,57 ± 0,47	3,63 ± 0,66	NS
HCT [%]	34,91 ± 3,94	35,82 ± 5,65	NS
WBC [10 <sup>9</sup> /L]	6,23 ± 1,73	5,86 ± 1,87	NS
PLT [10 <sup>9</sup> /L]	199,52 ± 76,66	148,18 ± 53,89	<b>0,03</b>
Fe [µmol/L]	67,71 ± 23,74	91 ± 30,55	NS
ferrytyna [ng/mL]	951,38 ± 506,65	1313,84 ± 1038,24	NS
całkowity cholesterol [mg/dL]	191,47 ± 55,44	161,09 ± 28,11	NS
HDL cholesterol [mg/dL]	52,82 ± 26,88	37,72 ± 12,09	NS
LDL cholesterol [mg/dL]	110,28 ± 49,02	99,30 ± 23,63	NS
triglicerydy [mg/dL]	141,82 ± 58,23	120,27 ± 35,22	NS
glukoza [mg/dL]	92,7 ± 9,83	91,63 ± 10,6	NS
ALT [IU/L]	17,23 ± 8,45	13,9 ± 6,44	NS
AST [IU/L]	14,7 ± 6,22	16,3 ± 4,8	NS
bilirubina [mg/dL]	0,5 ± 0,21	0,6 ± 0,23	NS

cd. tabeli 8.

Zmienna	CKD5 n = 25		
	CKD5A n = 14	CKD5B n = 11	P*
albuminy [g/dL]	3,93 ± 0,75	3,71 ± 0,57	NS
białko całkowite [g/dL]	6,73 ± 0,89	6,48 ± 0,65	NS
wapń całkowity [mg/dL]	10,02 ± 4,35	9,07 ± 0,89	NS
PO43- [mg/dL]	7,53 ± 4,13	6,04 ± 1,99	NS
iPTH [pg/mL]	360,31 ± 195,69	259,37 ± 221,52	NS
eGFR [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	4,11 ± 4,9	7,7 ± 9,1	NS
grubość blaszki miażdżycowej (IMT)	0,69 ± 0,27	1,25 ± 0,14	<b>0,00</b>

Grupa CKD5A – osoby żyjące, grupa CKD5B – osoby zmarłe z powodów sercowo-naczyniowych w ciągu roku obserwacji. Dane odnoszące się do przyjmowanych przez pacjentów leków przedstawione w postaci liczby osób [n] regularnie przyjmujących lek z danej grupy leków, z uwzględnieniem procentowego udziału tych osób (%), w stosunku do pozostałych chorych z danej grupy, tj. tych, które w momencie włączenia do badania danego leku nie przyjmowały; [n] – liczba chorych, (%) – procentowy udział.

\*Analizy porównawcze w odniesieniu do zmiennych ilościowych pomiędzy grupami wykonano przy użyciu testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa. Natomiast analizy porównawcze w zakresie zmiennych jakościowych zostały przeprowadzone przy użyciu testu  $\chi^2$ . Wyróżniono wartość P, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; NS – oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie analizowanego parametru.

## 5.2. Metodyka badań

Dla realizacji celów badawczych zaplanowano cztery rodzaje badań, tj. badania wykonywane w laboratorium: rutynowe i dodatkowe, badania proteomiczne, ocenę grubości blaszki miażdżycowej oraz badania systemowe.

### 5.2.1. Badania laboratoryjne

#### A. Pobieranie i przechowywanie próbek krwi

Próbki krwi od wszystkich zakwalifikowanych do badania osób były pobierane w możliwie zbliżonym okresie czasu, tak aby nie różniły się znacząco okresem przechowywania. Procedura pobraniowa była taka sama w grupach HV, CKD1-2, CKD3-4 i CKD5. Próbki krwi były pobierane od wszystkich osób będących na czczo, w godzinach pomiędzy 8:00 a 9:00. Jedynie pobranie krwi od pacjentów dializowanych, tj. z grupy CKD5, musiało być zsynchronizowane z harmonogramem dializ. Pacjenci ci mieli pobieraną krew rano (przed podaniem heparyny) przed drugą dializą w tygodniu, w dniu, w którym mieli zaplanowane wykonywanie rutynowych badań kontrolnych krwi.

Wszystkie próbki były przechowywane w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  i przetwarzane w taki sam sposób. Analizy poszczególnych parametrów były wykonywane stale przez te same osoby w zbliżonych warunkach atmosferycznych.

#### B. Oznaczanie wybranych parametrów

W ramach badań rutynowych w momencie włączenia do badania osoby biorace w nim udział miały oznaczane w Centralnym Laboratorium Analityczno-Biochemicznym Szpitala Klinicznego nr 2 w Poznaniu następujące parametry:

- **morfologię krwi** – przy użyciu analizatora hematologicznego Sysmex K-4500 firmy ICN,
- **parametry gospodarki żelazowej**: stężenie żelaza – przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus, firmy Roche Diagnostics, stężenie ferrytyny – przy użyciu analizatora biochemicznego Modular E-170, firmy Roche Diagnostics,
- **poziom glikemii** – przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus, firmy Roche Diagnostics,
- **parametry gospodarki lipidowej**: cholesterol całkowity, cholesterol frakcji HDL, triglicerydy (TAG)) – przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus, firmy Roche Diagnostics, stężenie cholesterolu frakcji LDL wyznaczono na podstawie równania Friedewalda:  $\text{LDL-chol} [\text{mmol/l}] = \text{chol. ca\k{.}} - \text{HDL-chol} - \text{TG}/2,2$ ,

- **parametry gospodarki wątrobowej:** aktywność ALT, AST oraz stężenie bilirubiny – przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus, firmy Roche Diagnostics,
- **stężenie kreatyniny** metodą kolorymetryczną wg Jaffe – przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus, firmy Roche Diagnostics,
- **stężenie mocznika** – przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus, firmy Roche Diagnostics,
- **parametry gospodarki wapniowo-fosforanowej:** stężenie wapnia całkowitego i fosforanów – przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus, firmy Roche Diagnostics) oraz iPTH – przy użyciu analizatora biochemicznego Modular E-170 firmy Roche Diagnostics,
- **stężenie albumin i białka całkowitego** – przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus, firmy Roche Diagnostic).

Dodatkowo, po zebraniu wszystkich próbek krwi od osób zakwalifikowanych do badania, oznaczano następujące profile:

a) stan zapalny

- stężenie **neopteryny** w surowicy krwi oznaczano metodą immunoenzymatyczną ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) z użyciem zestawu Neopterin ELISA, firmy DRG International, Inc., USA,
- stężenie **interleukiny 18 (IL-18)** w surowicy krwi oznaczano metodą ELISA z użyciem zestawu Human IL-18 ELISA Kit, firmy MBL Ltd, Japan,
- stężenie **wysoce czułego białka C-reaktywego (hsCRP)** w surowicy krwi oznaczano metodą immunonefelometryczną, używając testów o wysokiej czułości high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) firmy DADE Behring, USA i nefelometru DADE Behring Analyzer II.

b) stres oksydacyjny

- stężenie **metaloproteinazy 9 (MMP-9)** w surowicy krwi oznaczano metodą ELISA przy użyciu zestawu Quantikine Human MMP-9 (total), firmy R&D Systems, Canada,
- stężenie **tkankowego inhibitora metaloproteinaz 1 (TIMP-1)** w surowicy krwi oznaczano metodą ELISA za pomocą zestawu Quantikine Human TIMP-1, firmy R&D Systems, Canada,
- **wskaźnik MMP-9/TIMP-1** – wyliczano poprzez iloraz stężenia MMP-9 i stężenia TIMP-1,
- stężenie **paraoksonazy 1 (PON1)** oznaczano metodą ELISA, za pomocą zestawu Human serum paraoxonase 1 (PON1) ELISA kit, firmy USCN Life Science Inc. Wuhan, China,
- stężenie **asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA)** w surowicy krwi oznaczano metodą ELISA, przy pomocy zestawu ADMA firmy Immunodiagnostic AG, Germany,
- stężenie **mieloperoksydazy (MPO)** w surowicy krwi oznaczano metodą ELISA za pomocą testu Quantikine Human MPO, firmy R&D Systems, Canada.

Ponadto u wszystkich dokonywano stratyfikacji ryzyka zgonu sercowo-naczyniowego na podstawie stężenia w surowicy krwi **N-końcowego fragmentu prohormonu peptydu natriuretycznego typu B** (ang. *N-terminal pro-brain natriuretic peptide*, Nt-proBNP). Parametr ten oznaczano metodą immunoenzymatyczną przy użyciu zestawu Nt-proBNP firmy Biomedica, Slovakia.

Badania w zakresie oceny parametrów należących do wspomnianych dwóch profili oraz ocena stężenia Nt-proBNP wykonywane były w Pracowni Immunopatologii Chorób Nerek i Zgodności Tkanek przez dr Elżbietę Pawliczak.

Dodatkowo u wszystkich pacjentów z grupy CKD5 oceniano rutynowo adekwatność dializy. W tym celu obliczano współczynnik Kt/V, oznaczający klirens mocznika w czasie, odnoszony do przestrzeni dystrybucji. Współczynnik ten był obliczany z pomocą programu komputerowego „Nephron v. 1.2 for Windows”. Obecnie uważa się, że dla pacjentów leczonych 3 razy w tygodniu HD minimalna wartość spKt/V powinna wynosić 1,2, przy czym zaleca się, aby osiągała wartości 1,3–1,4, co warunkuje dobre odległe wyniki [145].

## 5.2.2. Badania proteomiczne

### A. Przygotowywanie próbek krwi do badań proteomicznych

W pierwszym etapie badań, krew, w ilości 4 mL pobrana uprzednio do probówek zawierających kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA), była wirowana w temperaturze pokojowej (z prędkością 1000 g przez 15 minut), w celu oddzielenia osocza od frakcji komórkowej. Uzyskany supernatant był następnie ponownie wirowany w takich samych warunkach. Trzecie z kolei wirowanie odbywało się w temperaturze 4°C (z prędkością 16 000 g przez 15 minut). Przygotowane w ten sposób próbki były natychmiast zamrażane w temperaturze -80°C.

### B. Wykonanie badań

Na odpowiednio przygotowanym i oczyszczonym osoczu przeprowadzano izolację białek z wykorzystaniem metody trizolowej.

Oczyszczone białka poddawane były separacji za pomocą elektroforezy dwukierunkowej denaturującej 2DE, dzięki której na jednym żelu można rozdzielić i zwizualizować nawet do kilku tysięcy białek. W pierwszym wymiarze białka rozdzielane były zgodnie z ich punktem izoelektrycznym (pI), czyli wielkością pH, przy której ich ładunek wypadkowy jest równy zero (białka były poddane tzw. ogniskowaniu izoelektrycznemu (ang. *isoelectrophocusing*, IEF), natomiast w drugim wymiarze białka były separowane zgodnie z ich masą cząsteczkową metodą SDS-Page (ang. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Powstały w ten sposób obraz obejmował wiele plam, z których każda stanowiła białko charakteryzujące się określonymi parametrami masy cząsteczkowej

i pI. Ta mapa białkowych plam (ang. *spots*) jest często traktowana jak „białkowy odcisk palca” analizowanej próby, a metoda określana mianem masowego odcisku palca peptydu (ang. *peptide mass fingerprinting*, PMF). W osoczu ludzkim od 50 do 70% białek stanowią albuminy, a ponad 20% to immunoglobuliny G, co sprawia, że uzyskane obrazy 2D nie są tak czytelne jak obrazy białek np. szpiku kostnego oraz, że większość zidentyfikowanych w próbach białek stanowią albuminy lub produkty ich degradacji. W celu polepszenia rozdzielczości tych trudnych technicznie białek, wykorzystuje się do elektroogniskowania paski żelu z różnymi zakresami immobilizowanego gradientu pH (ang. *immobilizing PH gradient*, IPG). W badaniu wykorzystywano dwa zakresy IPG, tj. 4–7 oraz 6–9.

Analizy proteomiczne prowadzone były początkowo na pełnych mieszaninach białek osocza. Dla każdej z analizowanych próbek wykonano trzykrotną analizę białek. Etapem kończącym elektroforezę 2DE była wizualizacja map białkowych przy użyciu techniki Blue Silver. Metoda ta wykorzystuje standardowy protokół barwienia Coomassie Brilliant Blue z pewnymi modyfikacjami [40]. Po wizualizacji, uzyskane elektroforetogramy poddawane były szczegółowej analizie z wykorzystaniem programu Image Master Platinum 6,0 (GE Healthcare), w celu znalezienia plamek białek, które wykazywały zmiany ilościowe lub jakościowe w porównaniu do próbek kontrolnych (HV).

Plamki białek różnicujących były następnie wycinane z żelu, a białka w nich zawarte poddawane były degradacji enzymatycznej za pomocą trypsyny. Powstałe w ten sposób mapy peptydowe analizowano przy użyciu spektrometru masowego (MALDI-ToF), wykorzystującego metodę łagodnej jonizacji. Metoda ta nie powoduje fragmentacji cząsteczek, a jedynie ich jonizację dzięki przekazanej energii z matrycy wzbudzonej wiązką lasera. Po jonizacji cząsteczek w stanie gazowym, a następnie ich rozdzieleniu w zależności od stosunku ich masy do ładunków ( $m/z$ ) powstaje widmo masowe, które stanowi podstawę do identyfikacji cząsteczki białka. Stąd, przy wykorzystaniu tego spektrometru uzyskuje się jedynie mapy peptydowe, które następnie porównuje się z danymi zawartymi w bazach białkowych i dopiero na tej podstawie dokonuje się identyfikacji białka. Minusem tej metody jest brak możliwości ustalenia sekwencji aminokwasowej badanego białka, w efekcie możliwa staje się jedynie identyfikacja białek, które są już znane, a ich sekwencje znajdują się w bazach danych [187]. W badaniu uzyskane widma masowe map peptydowych porównywano z widmami baz danych Mascot [198]. Przebadano w ten sposób 160 plamek białek, wśród których zidentyfikowano 42 białka. Wszystkie obecne na żelach plamki występowały w licznych izoformach różniących się między sobą masą cząsteczkową lub punktem izoelektrycznym. Większość z analizowanych białek wykazywała stałą akumulację w osoczu u poszczególnych grup badawczych, zidentyfikowano jednak również takie białka, które wykazywały charakterystyczne zmiany w akumulacji.

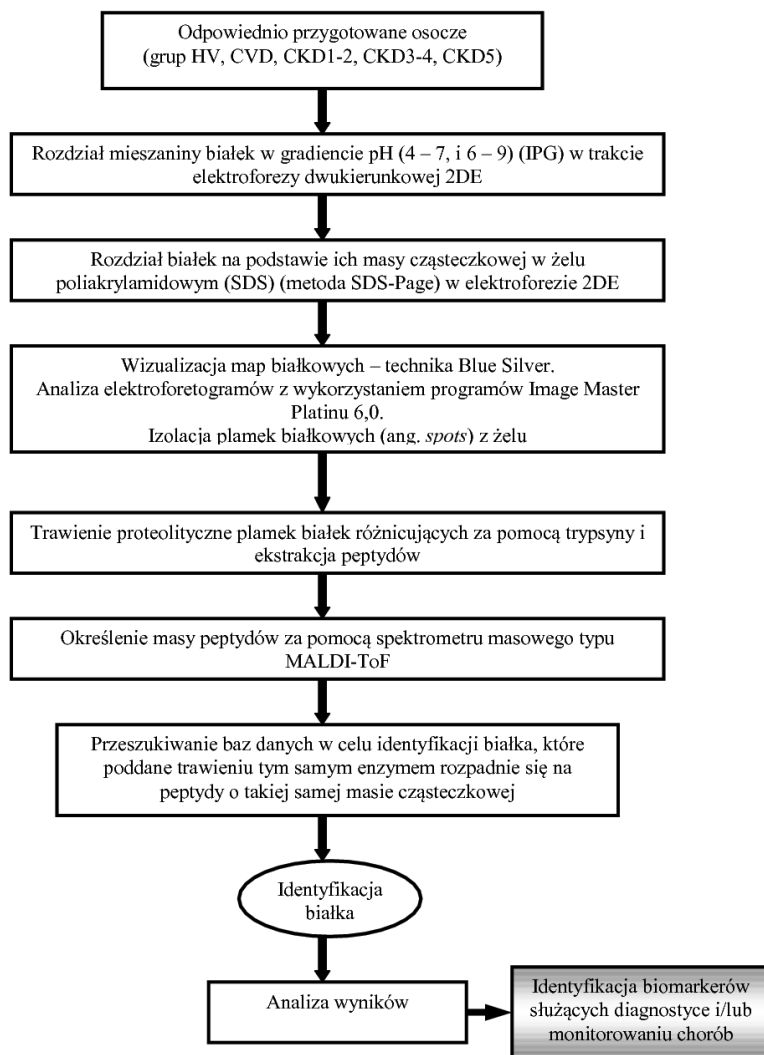
W celu wykluczenia zmian w profilach białek wynikających z różnic osobniczych zarówno z obrazów białek kontrolnych, jak i poszczególnych grup sporzą-

dzono tzw. żele syntetyczne będące nałożeniem wszystkich prób należących do danej grupy badanej. Do analiz porównawczych były wytypowane tylko te białka, które powtarzalnie występowały w profilach białkowych u co najmniej 90% badanych z danej grupy. Następnie przeprowadzono normalizację i kompleksową analizę uzyskanych danych. Uzyskane wyniki przedstawiano jako względną kumulację [%vol] (ang. *relative abundance*) każdej plamki rozumianej jako zależność powierzchni + intensywności tej plamki podzielonej (znormalizowanej) przez objętość wszystkich uzyskanych plamek w danej analizie. Zarówno stworzenie obrazów syntetycznych jak i normalizacja wyników były przeprowadzone z wykorzystaniem oprogramowania Image Master Platinum. Na rycinie 14. przedstawiono w sposób schematyczny najważniejsze etapy na drodze identyfikacji białek wielkocząsteczkowych.

Analizy proteomiczne białek niskopijnych przeprowadzono po usunięciu z badanego materiału tych białek, które występowały w największych stężeniach i uniemożliwiały analizę ekspresji białek niskopijnych. W badaniu, początkowo, zastosowano zestawy do usuwania albumin i immunoglobulin (GE Healthcare). Nie dały one jednak spodziewanych rezultatów. W związku z tym, do usuwania białek wykorzystano technikę chromatografii powinowactwa na kolumnie wypełnionej złożem skoniugowanym z przeciwciałami wiążącymi, tzw. *high-abundant proteins*. Izolacja białek z zastosowaniem chromatografii powinowactwa zachodzi w warunkach natywnych, dzięki czemu wraz z albuminą usuwane są również białka i peptydy z nią związane. Aby usunąć wszelkie oddziaływania w obrębie albuminomu i aby nie utracić cennych informacji o białkach związanych z białkami nośnikowymi, izolacja białek z wykorzystaniem filtrów o danym punkcie odcięcia, tj. 30 i 50 kDa przeprowadzana była w warunkach denaturujących. Osocza poddane zostały w ten sposób deplecji albumin oraz sześciu innych białek, takich jak: haptoglobina, fibrynogen, IgG, IgA, antytrypsyna i transferyna, występujących w osoczu w bardzo dużych ilościach.

Wyizolowana populacja białek niskocząsteczkowych analizowana była następnie z ponownym wykorzystaniem spektrometrii mas MALDI-ToF z ominięciem etapu elektroforezy. Rozkład zmian w profilach tej frakcji białek ujawnił białka podlegające zróżnicowanej akumulacji w różnych badanych grupach. Jednocześnie te same frakcje białek analizowano pod względem występowania modyfikacji potranslacyjnych: glikozylacji i fosforylacji. W tym celu białka rozdzielano metodą jednokierunkową SDS-Page, a następnie uzyskane żele barwiono z użyciem zestawów do znakowania fluorescencyjnego reszt oligosacharydowych (Pro-Q Emerald, Molecular Probes) i fosforowych (Pro-Q Diamond, Molecular Probes). Zwizualizowane prążki analizowano densytometrycznie w celu znalezienia różnic w poziomie modyfikacji poszczególnych białek. Uzyskane wyniki zostały potwierdzone za pomocą spektrometrii mas i analiz *in silico* z wykorzystaniem programu Mascot™.





**Rycina 14.** Schemat najważniejszych etapów na drodze identyfikacji białek osocza w badaniach proteomicznych (na podstawie [63]).

Badania analizy proteomu zostały przeprowadzone w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, który dysponuje narzędziami niezbędnymi do wykonywania badań proteomicznych, tj. spektrometrem masowym z jonizacją przez desorpcję laserową w stałej matrycy z analizatorem czasu przelotu (ang. *matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry*, MALDI-ToF-MS) – model Autoflex (firma Bruker Daltonics, Germany) oraz zestawem do dwukierunkowych (dwuwymiarowych) rozdzielów elektroforetycznych (*2-dimensional electrophoresis*, 2DE) z serii EttanDalt (Amersham Ettan IPGphor III do rozwijania I kierunku i EttanDalt Six do II kierunku). W Insty-

tucie tym zoptymalizowano metody uzyskiwania map proteomicznych z wykorzystaniem ludzkich białek oraz dopracowano metodykę identyfikacji tych białek z użyciem spektrometru MALDI-ToF. Osobą, która przeprowadzała wszystkie eksperymenty laboratoryjne w ramach badań proteomicznych była dr Magdalena Łuczak – wykonawca grantu „*Analiza molekularnych podstaw powstawania miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek oraz w niestabilnej chorobie wieńcowej*”. Uzyskane wyniki były następnie konsultowane z prof. Markiem Figlerowiczem – jednym z głównych wykonawców wspomnianego grantu.

Analizy proteomiczne przeprowadzone zostały w ramach realizacji dwóch zadań badawczych. Jednym z nich była identyfikacja białek odgrywających istotną rolę w procesie powstawania miażdżycy w PChN, drugim natomiast analiza modyfikacji potranslacyjnych zachodzących w PChN pod wpływem miażdżycy.

### 5.2.3. Ocena grubości i blaszki miażdżycowej

*Pomiar grubości kompleksu błony wewnętrznej i błony środkowej tętnicy szyjnej (ang. intima media thickness, IMT)*

Pomiar IMT był dokonywany za pomocą ultrasonografii dopplerowskiej, przy użyciu głowicy naczyniowej operującej częstotliwościami 7–10 MHz. Badanie trwało nie więcej niż 10 min i wykonywane było u chorego w pozycji leżącej, z lekko uniesioną głową, skręconą w kierunku przeciwnym do ocenianej tętnicy. Pomiar dotyczył dalszej ściany tętnicy (widocznej u prawie wszystkich chorych) – od zarysu intymy do dalszej linii m – granicy pomiędzy błoną środkową a przydanką. Oceniana była wartość średnia dla pomiarów prawej i lewej tętnicy szyjnej wspólnej mierzonych 2 cm proksymalnie od rozwidlenia, z pominięciem obszarów widocznych blaszek miażdżycowych. Zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego i Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego [192], za prawidłową wartość IMT uznawano wartość nie przekraczającą 0,9 mm, wartość IMT pomiędzy 0,9–1,5 mm określano jako pogrubienie kompleksu IMT, a wartość > 1,5 mm uznawano za objaw miażdżycy. W analizach i przy wnioskowaniu uwzględniano też fakt, że wzrost wartości IMT > 1 mm zwiększa ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn [119].

Pomiary IMT były wykonywane w Oddziale Klinicznym Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych Szpitala Klinicznego nr 2 im. Heliodora Świącickiego w Poznaniu przez dr Agatę Milewską.

### 5.2.4. Badania systemowe

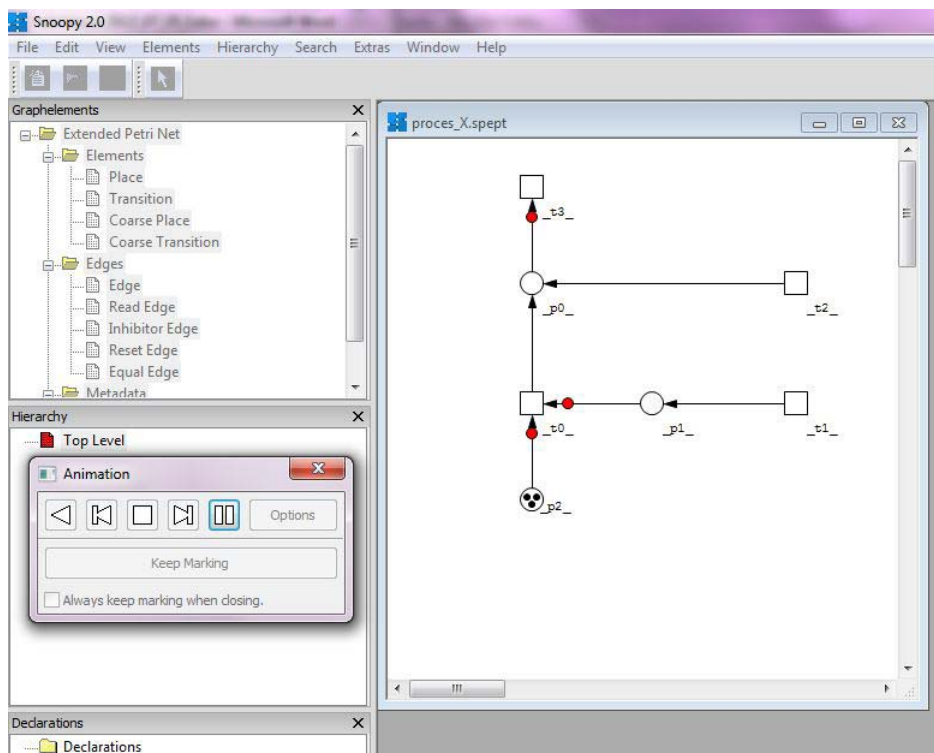
Do stworzenia modeli dwóch procesów biologicznych za pomocą sieci Petriego wykorzystano program Snoopy, ogólnie dostępny na stronie <http://www-dsz.informatik.tu-cottbus.de/> [115, 117].

Program ten został użyty do stworzenia wszystkich prezentowanych w rozprawie sieci. Umożliwia on rozrysowanie modelowanego procesu za pomocą miejsc, tranzycji i łączących je łuków, wspiera także tworzenie miejsc logicznych. Każdemu miejscu można w nim przydzielić konkretną liczbę znaczników, która zostaje przypisana w oznakowaniu początkowym. Po utworzeniu sieci istnieje możliwość wykonania animacji, aby przeprowadzić symulację działania sieci. Po takiej symulacji można przywrócić oznakowanie początkowe sieci albo można zachować to oznakowanie, które pojawiło się na końcu symulacji.

Na rycinie 15. przedstawiono okno programu Snoopy w trybie animacji procesu X. Widać na nim tokeny w postaci czerwonych kulek, przepływające z miejsca  $p_0$  do tranzycji  $t_3$  oraz z miejsca  $p_1$  oraz  $p_2$  do tranzycji  $t_0$ . W miejscu  $p_2$  znajdują się 3 znaczniki.

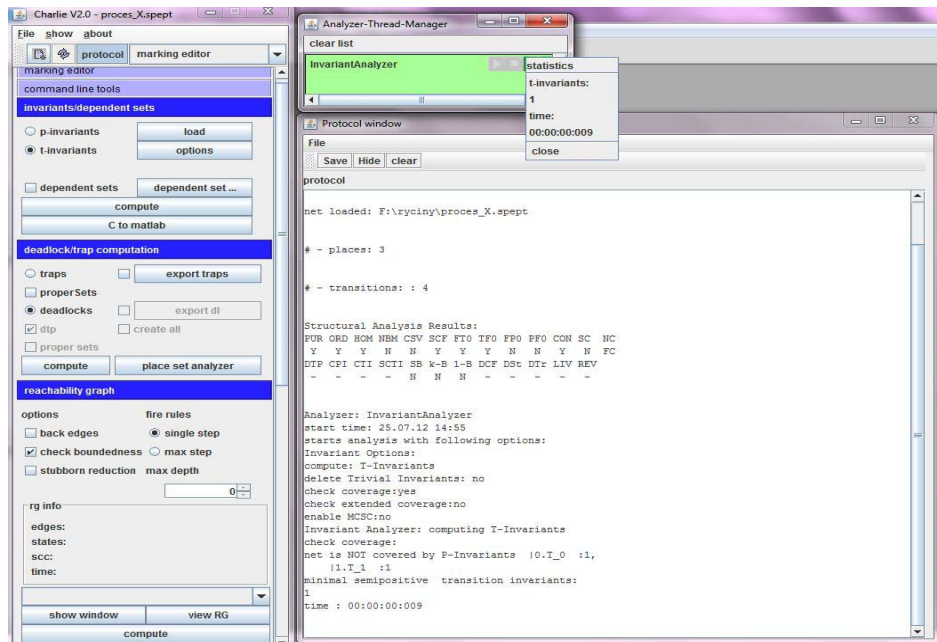
Do analizy sieci narysowanych w programie Snoopy korzystano z programu Charlie [316], który jest ogólnie dostępny na stronie <http://www-dsz.informatik.tu-cottbus.de/>.

Program ten umożliwia bezpośredni import sieci narysowanej w programie Snoopy oraz pozwala m.in. na obliczenie  $t$ -niezmienników, analizę pokrycia sieci oraz ocenę większości właściwości strukturalnych i behawioralnych sieci.



Rycina 15. Okno programu Snoopy pokazujące model procesu X w trybie animacji.

Na rycinie 16. przedstawiono okno programu Charlie. Widać w nim wyniki analizy  $t$ -niezmienników ( $t$ -invariants) procesu X pokazanego uprzednio na rycinie 15. W sieci, w której przedstawiono proces X, występuje jeden  $t$ -niezmiennik (ang. *minimal semipositive transition invariants: 1*), ale sieć nie jest pokryta (ang. *net is NOT covered*), co można odczytać w okienku Protocol window. Oznacza to, że istnieją w tej sieci takie tranzycje, które nie mają wpływu na działanie sieci.



Rycina 16. Okno programu Charlie przedstawiające wyniki analizy  $t$ -niezmienników procesu X zaprezentowanego na rycinie 15.

Do sieci skomplikowanych, tj. sieci regulacji metabolizmu cholesterolu oraz sieci przedstawiającej udział interleukiny-18 w rozwoju i progresji miażdżycy, dla których liczba obliczonych  $t$ -invariantów przekraczała 1000 zamiast programu Charlie, który w ich wypadku zaczął generować nieprawidłowe wyniki, do analizy  $t$ -invariantów zastosowano ogólnie dostępny program do analizy sieci INA – *Integrated Net Analyzer* ([www2.informatik.hu-berlin.de/lehrstuehle/automaten/ina/](http://www2.informatik.hu-berlin.de/lehrstuehle/automaten/ina/)).

W celu obliczania realnych  $t$ -niezmienników oraz zbiorów MCT zostały napisane nowe programy obliczeniowe (w ramach współpracy z Instytutem Informatyki Politechniki Poznańskiej).

Klastrowanie  $t$ -niezmienników i ich analizę przeprowadzono przy użyciu programu *Statistica wersja 10*. oraz w oparciu o programy napisane w języku R w Instytucie Informatyki Politechniki Poznańskiej.

### 5.2.5. Analizy statystyczne

Analizowane dane przedstawiano w postaci średnich wartości wraz z odchyleniem standardowym (SD) albo w formie średnich wartości wraz z 95% przedziałem ufności, albo w postaci odsetkowej (%). W przypadku badań proteomicznych wyniki akumulacji poszczególnych białek grup CKD oraz grupy CVD były porównywane w stosunku do wyników uzyskanych od grupy HV i przedstawiane jako względne zmiany akumulacji tych białek [%vol/%vol].

Każdą zmienną o charakterze ilościowym (ciągłym) oceniano pod względem jej zgodności z rozkładem normalnym, analizowano w tym celu histogram i korzystano z testów Kołmogorowa-Smirnowa.

Zmienne o rozkładzie normalnym analizowano metodami parametrycznymi. W celu oceny różnic pomiędzy takimi zmiennymi wykorzystywano test t-Studenta oraz analizę wariancji ANOVA. Z kolei zmienne, których rozkład nie był zgodny z rozkładem normalnym analizowano wykorzystując metody nieparametryczne. Dla porównania dwóch niezależnych prób o charakterze ilościowym stosowano test U Manna-Whitneya. Natomiast w celu wykonania analiz porównawczych dla co najmniej trzech grup badanych stosowano test Kruskala-Wallisa oraz testy mediany. W analizie wariancji korzystano z testów post-hoc – NIR (najmniejszych istotnych różnic) i Scheffego. Dla oceny zależności pomiędzy zmiennymi ciągłymi stosowano współczynnik korelacji Spermmana.

Związki pomiędzy zmiennymi jakościowymi oceniano za pomocą testu  $\chi^2$ .

W celu oceny znaczenia zmiennych niezależnych występujących w opisie zmiennej zależnej wykorzystywano metodę analizy regresji wieloczynnikowej. Analiza regresji zajmuje się opisem i oceną zależności pomiędzy wybraną zmienną traktowaną jako efekt wpływu jednej lub kilku innych zmiennych, które są w tej sytuacji traktowane jak przyczyny. W badaniu wykorzystywano metodę regresji krokowej postępującej (ang. *forward selection*). Metoda ta skwencyjnie, tj. krok po kroku, umożliwia stworzenie najlepszego modelu regresji. Polega na dołączaniu do listy zmiennych objaśniających kolejnych zmiennych aż do uzyskania „najlepszego” modelu.

Badanie ryzyka zgonu przeprowadzono przy pomocy modelu proporcjonalnego hazardu Coxa, natomiast funkcję przeżycia oszacowano za pomocą metody Kaplana-Meiera. W celu porównania krzywych przeżycia stosowano test log-rank.

We wszystkich testach jako istotną statystycznie uznawano wartość  $P < 0,05$  [282, 283].

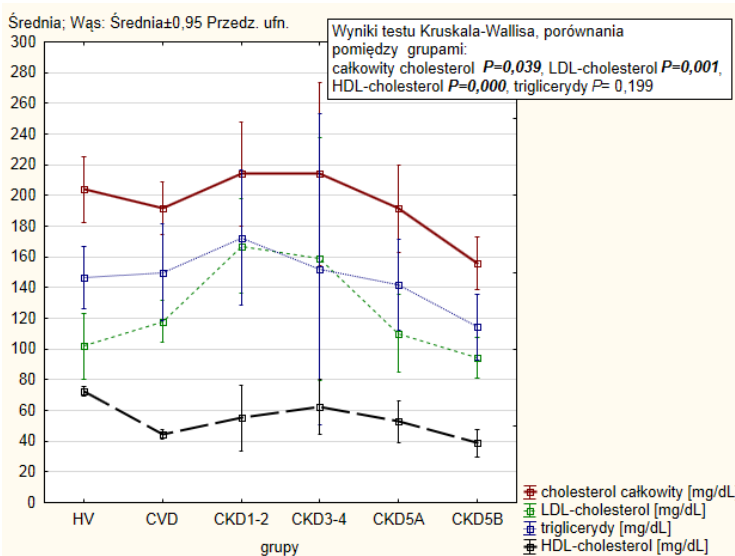
Obliczenia statystyczne wykonywano z wykorzystaniem programu *Statistica v. 10.* firmy Stat Soft Inc. Polska, licencjonowanego dla Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

## 6. Wyniki

### 6.1. Badania laboratoryjne

#### 6.1.1. Profil lipidowy

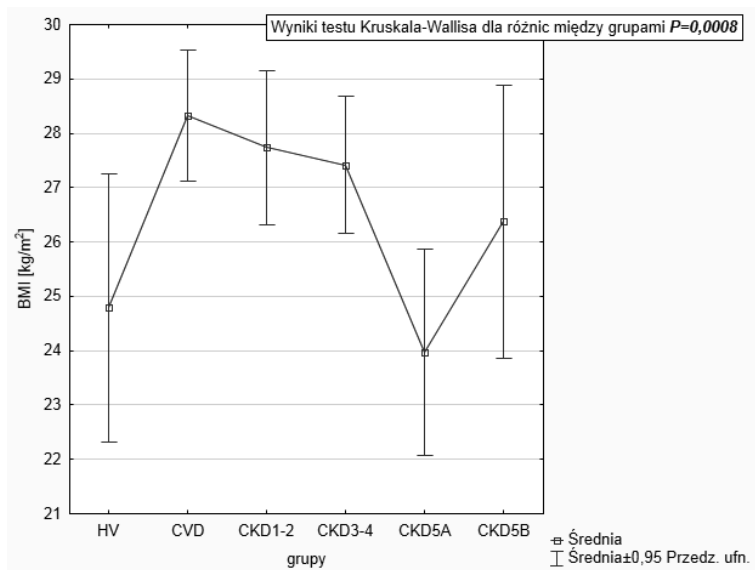
W ramach profilu lipidowego oznaczono stężenie całkowitego cholesterolu, LDL-cholesterolu, HDL-cholesterolu i triacylogliceroli. Wykazano różnice istotne statystycznie pomiędzy badanymi grupami w zakresie stężenia w surowicy krwi całkowitego cholesterolu, HDL-cholesterolu oraz LDL-cholesterolu. Natomiast badani nie różnili się istotnie statystycznie stężeniem triacylogliceroli. Pacjenci grupy CKD5B charakteryzowali się najniższym stężeniem cholesterolu całkowitego w porównaniu z pozostałymi grupami. Różnice w zakresie HDL-cholesterolu dotyczyły grup pacjentów hemodializowanych i grupy HV. Chorzy hemodializowani wykazywali statystycznie istotne obniżone stężenie HDL-cholesterolu. Z kolei najwyższymi stężeniami LDL-cholesterolu charakteryzowali się chorzy grup CKD1-2 i CKD3-4, którzy różnili się pod tym względem istotnie statystycznie w porównaniu z pozostałymi grupami, w których stężenie LDL-cholesterolu



Rycina 17. Porównanie zmian profilu lipidowego badanych grup.

było zbliżone. Profil lipidowy badanych osób został przedstawiony zbiorczo w tabelach 7. i 8. oraz na rycinie 17.

Ponadto zauważono, że pacjenci z grupy CKD5A charakteryzowali się najniższymi wskaźnikami BMI, co zostało przedstawione na rycinie 18.



Rycina 18. Porównanie zmian wskaźnika BMI w badanych grupach.

### 6.1.2. Stan zapalny

Oceniono stężenia trzech wybranych parametrów stanu zapalnego w surowicy krwi, tj. stężenie neopteryny, interleukiny-18 i wysoce reaktywnego białka CRP. Badane grupy różniły się istotnie statystycznie w ramach stężeń wszystkich analizowanych parametrów zapalnych. Wyniki zostały przedstawione w tabeli 9.

#### Neopteryna

Najwyższe stężenie neopteryny w surowicy krwi obserwowano w grupie pacjentów hemodializowanych. Jednocześnie nie zauważono w tym zakresie różnic pomiędzy grupami CKD5A i CKD5B. Rozkład zmian stężeń neopteryny w surowicy krwi w zależności od badanej grupy został przedstawiony na rycinie 20. Dodatkowo w tabeli 10. przedstawiono różnice pomiędzy grupami z zaznaczeniem różnic istotnych statystycznie. Widać wyraźnie, że różnice pomiędzy grupami HV, CVD, CKD1-2 i CKD3-4 były statystycznie nieistotne. Natomiast różnice pomiędzy tymi grupami a grupami pacjentów hemodializowanych miały znamiona statystycznej istotności. Jednocześnie zaobserwowano, że wraz z obniżą-

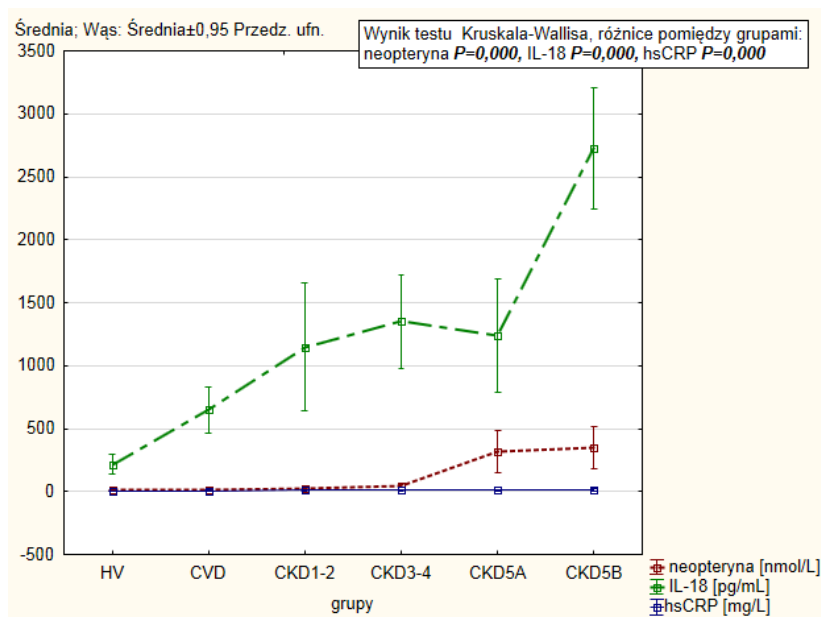
niem wielkości eGFR wzrastało stężenie neopteryny w surowicy krwi. Zależność tę przedstawiono na rycinie 21.

Przy użyciu metody Kaplana-Meiera oszacowano prawdopodobieństwo przeżycia. Ci spośród chorych dializowanych, tj. chorych z grupy CKD5, którzy

**Tabela 9.** Porównanie stanu zapalnego w oparciu o wielkość stężenia w surowicy neopteryny, IL-18 i hsCRP w poszczególnych grupach badawczych

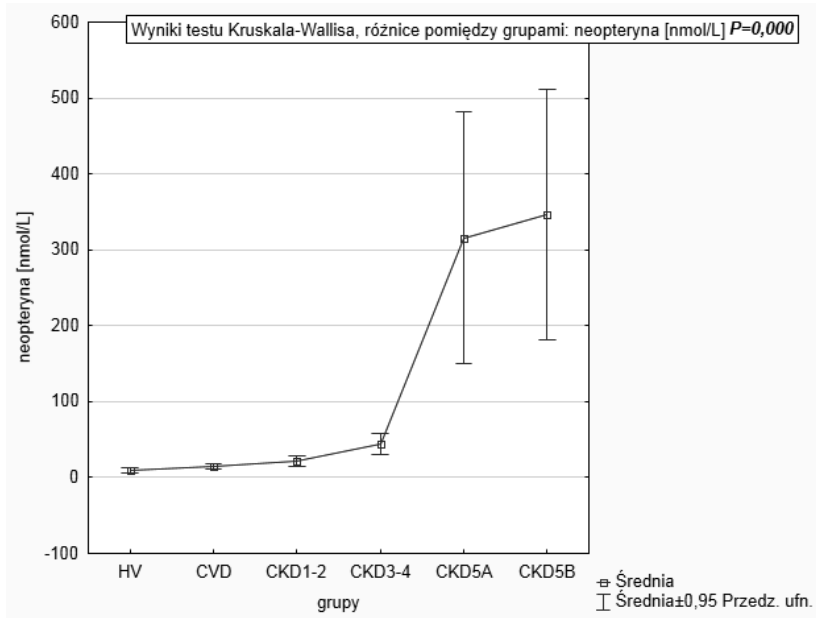
Parametr	HV	CVD	Grupa pacjentów z PChN				P*
			CKD				
			CKD1-2	CKD3-4	CKD5		
CKD5A	CKD5B						
neopteryna [nmol/L]	8,67 ± 5,17	14,90 ± 6,66	20,43 ± 16,08	40,62 ± 29,99	385,22 ± 302,45		0,000
					437,38 ± 377,65	345,02 ± 103,3	0,000
IL-18 [pg/mL]	242,76 ± 60,18	934,35 ± 487,66	1833,11 ± 1257,93	1929,08 ± 798,34	2413,81 ± 973,994		0,000
					1818,51 ± 1098,55	2872,67 ± 515,74	0,000
hsCRP [mg/L]	0,53 ± 0,73	6,92 ± 2,8	9,99 ± 8,26	10,71 ± 11,54	15,97 ± 13,3		0,000
					16,28 ± 13,21	15,70 ± 13,4	0,02

Wyniki przedstawione jako średnia ± SD. Dla porównań pomiędzy wszystkimi grupami stosowano test Kruskala-Wallisa. \*Wyróżniono wartość P, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; przeprowadzono analizy osobno dla pięciu i osobno dla sześciu grup, tj. z uwzględnieniem podziału grupy CKD5 na dwie podgrupy.

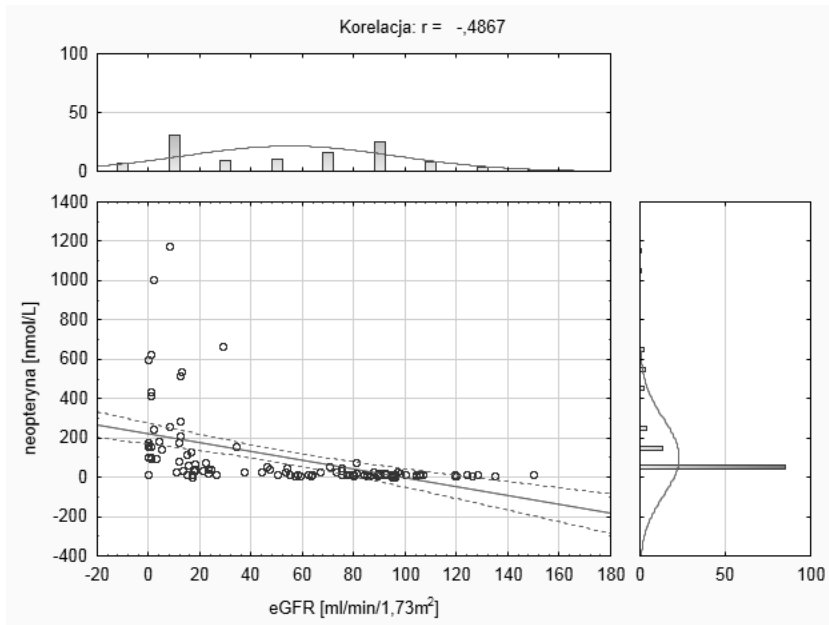


**Rycina 19.** Porównanie profilu zapalnego badanych grup.





Rycina 20. Zmiany stężeń neopteryny w surowicy krwi w badanych grupach.



Rycina 21. Wykres rozrzutu wraz histogramami i zaznaczonym za pomocą przerywanych linii 95% przedziałem ufności przedstawiający odwrotną zależność pomiędzy stężeniem neopteryny [nmol/L] a wielkością eGFR [ml/min/1,73m<sup>2</sup>]  $P = 0,000$ ,  $r = -0,486$ .

charakteryzowali się wyższymi lub równymi medianie wielkościami stężeń neopteryny w surowicy krwi w porównaniu do pozostałych chorych tej grupy, charakteryzowali się obniżoną przeżywalnością (log-rank test,  $P = 0,0000$ ). Wykres funkcji przeżycia w grupie pacjentów dializowanych, w zależności od stężenia neopteryny w surowicy krwi, został przedstawiony na rycinie 22.

Na podstawie wyników zawartych w tabeli przeżycia (Tabela 11) oraz analizie regresji proporcjonalnego hazardu Coxa (Tabela 12) można wywnioskować, że chory z podwyższonymi stężeniami neopteryny (mediana  $\geq 199,1$  nmol/L) w surowicy krwi ma zdecydowanie mniejsze szanse na przeżycie 12-miesięcznego okresu obserwacji w porównaniu z osobą hemodializowaną, która wykazuje stężenie neopteryny w surowicy krwi niższe od mediany. I tak na przykład 12 mie-

**Tabela 10.** Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu neopteryny w surowicy krwi

Neopteryna [nmol/L]	HV	CVD	CKD1-2	CKD3-4	CKD5A	CKD5B
HV		NS	NS	NS	0,000	0,000
CVD	NS		NS	NS	0,000	0,000
CKD1-2	NS	NS		NS	0,000	0,000
CKD3-4	NS	NS	NS		0,000	0,000
CKD5A	0,000	0,000	0,000	0,000		NS
CKD5B	0,000	0,000	0,000	0,000	NS	

W celu wykonania analizy porównań między sześcioma grupami wykorzystano jeden z testów post-hoc, tj. test Scheffego. Wyróżniono wartość  $P$ , gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; NS – oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie analizowanego parametru.

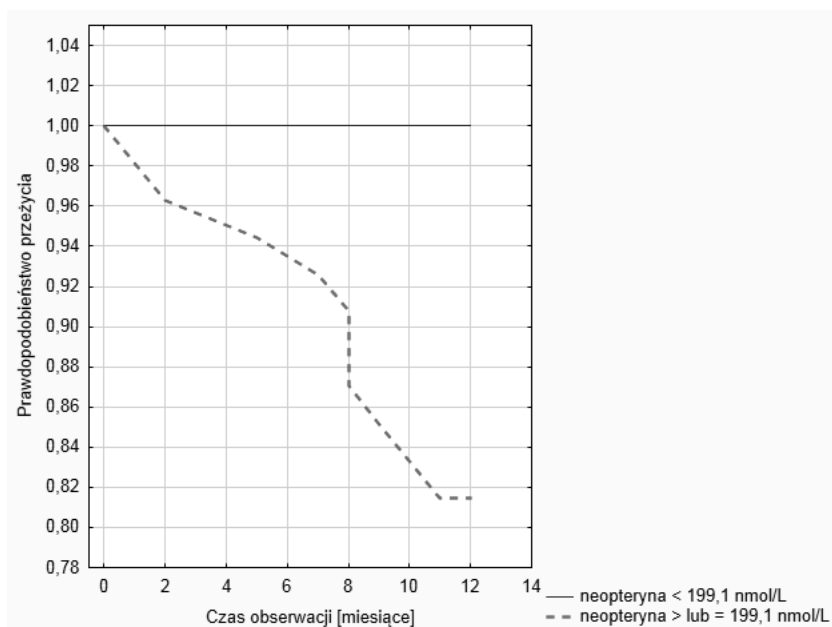
**Tabela 11.** Przeżycie w grupie chorych hemodializowanych w zależności od wielkości stężenia neopteryny

		Przeżycie [miesiące]							
		1	2	5	8	9	10	11	12
neopteryna [nmol/L]	< 199,1	100%							
	$\geq 199,1$	98,1%	96,2%	94,4%	88,7%	85,1%	83,3%	81,4%	

**Tabela 12.** Przedstawienie wyników regresji proporcjonalnego hazardu Coxa dla neopteryny

		Regresja proporcjonalnego hazardu Coxa Chi2 = 8,648, P = 0,0033							
zmienna	Beta	Błąd standardowy	Beta 95% dolna	Beta 95% górna	Wart t	Wald Statyst.	P	HR	95% CI
neopteryna	0,002	0,000	0,001	9,994	2,88	3,65	0,000	1,003	1,001–1,004

95% CI – 95% przedział ufności (ang. confidence interval), HR – współczynnik hazardu (ang. hazard ratio).



**Rycina 22.** Wykres funkcji przeżycia chorych hemodializowanych w zależności od wielkości stężenia neopteryny w surowicy. Wielkość grupująca dla neopteryny została dobrana w oparciu o wyliczoną medianę stężenia neopteryny dla całej grupy CKD5 = 199,1 nmol/L. Linia ciągła jest charakterystyczna dla chorych grupy CKD5, których stężenia neopteryny w surowicy krwi były niższe od mediany. Z kolei linia przerywana ukazuje kumulowaną proporcję przeżycia dla chorych, których stężenie neopteryny w surowicy krwi było wyższe lub równe medianie. Różnice pomiędzy grupami były istotne statystycznie (test Log-rank)  $P = 0,0000$ .

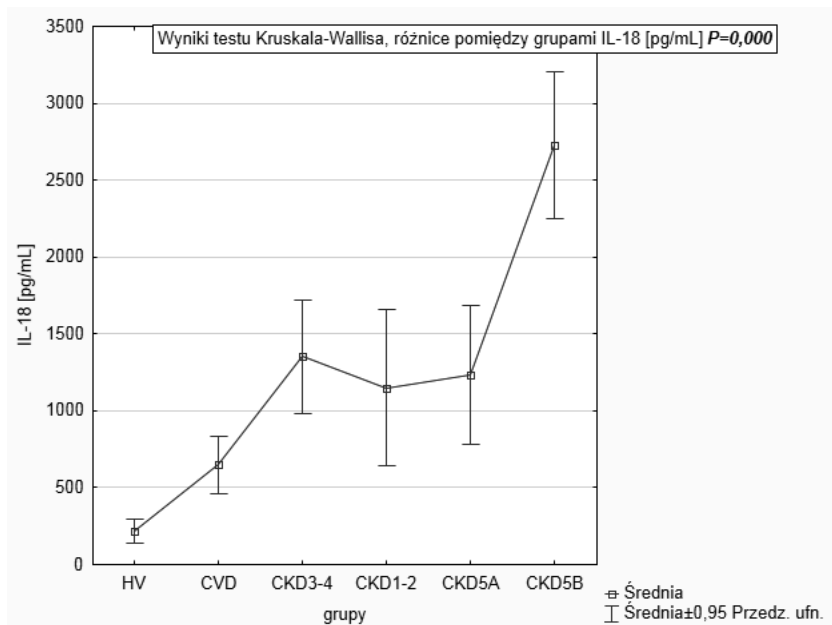
sięcy przeżyje 100% chorych z niższymi stężeniami IL-18, a jedynie 81,4% chorych ze stężeniami wyższymi od mediany. Współczynnik hazardu jest równy 1,003, co oznacza, że ci pacjenci dializowani, którzy charakteryzują się wyższymi stężeniami neopteryny mają 1,003 razy wyższe ryzyko zgonu w ciągu 12-miesięcznej obserwacji w porównaniu z chorymi dializowanymi, których stężenia neopteryny w surowicy krwi są niższe od mediany.

### Interleukina-18 (IL-18)

Największe stężenie IL-18 w surowicy krwi obserwowano w grupie chorych dializowanych, którzy następnie zmarli w czasie rocznej obserwacji. Stężenie IL-18 w tej grupie chorych było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu z wynikami oznaczeń IL-18 w surowicy krwi we wszystkich pozostałych grupach. Z kolei grupy CVD, CKD1-2 oraz CKD5A nie różniły się pod względem stężenia IL-18 ani w porównaniu z grupą HV, ani w stosunku do pozostałych chorych z PChN, z wyjątkiem wspomnianej grupy CKD5B. Dodatkową różnicę zaobserwowano jedynie w grupie chorych CKD3-4. Chorzy ci wykazywali znamienne wyższe stężenie IL-18 w porównaniu z HV. Pomimo braku istotnych statystycznie różnic

pomiędzy stężeniami IL-18 w surowicy chorych będących w różnych stadiach PChN widać było tendencję wzrostu stężenia IL-18 zależną od stopnia upośledzenia funkcji nerek. Analiza korelacji potwierdziła istnienie odwrotnej zależności pomiędzy wspomnianymi parametrami. Wyniki analiz zostały przedstawione na rycinie 23. i w tabeli 13.

Jednoczynnikowa analiza zależności pomiędzy stężeniem IL-18 a wybranymi parametrami została przedstawiona w tabeli 14. Można zauważyć, że stężenie IL-18 w surowicy krwi badanych było wprost proporcjonalne do wielkości BMI,



Rycina 23. Zmiany stężeń IL-18 w badanych grupach.

Tabela 13. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu IL-18 w surowicy krwi

IL-18 [pg/mL]	HV	CVD	CKD1-2	CKD3-4	CKD5A	CKD5B
HV		NS	NS	0,03	NS	0,000
CVD	NS		NS	NS	NS	0,000
CKD1-2	NS	NS		NS	NS	0,000
CKD3-4	0,03	NS	NS		NS	0,000
CKD5A	NS	NS	NS	NS		0,000
CKD5B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

Do analizy porównań między sześcioma grupami wykorzystano jeden z testów post-hoc, tj test Scheffego. Wyróżniono wartość P, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; NS – oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie analizowanego parametru.

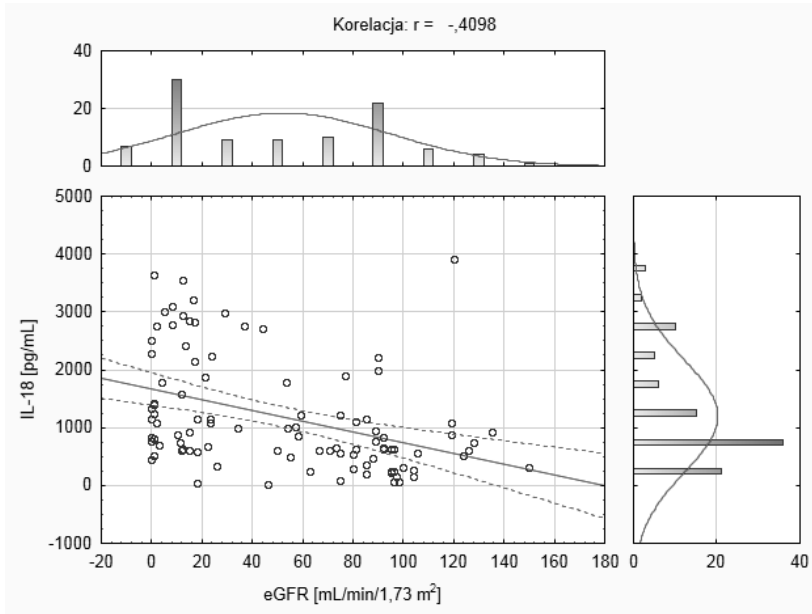
**Tabela 14.** Jednoczynnikowa analiza korelacji pomiędzy stężeniem IL-18 w surowicy krwi a wybranymi parametrami

Parametr	r	P
wiek [lata]	0,144	NS
płeć [K/M]	0,109	NS
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	0,261	<b>0,004</b>
czas leczenia dializami [miesiące]	0,273	<b>0,000</b>
adekwatność dializy	0,121	NS
IMT [mm]	0,357	<b>0,019</b>
leczenie statynami	-0,461	<b>0,021</b>
leczenie ACEI	0,412	<b>0,045</b>
glukoza [mg/dL]	0,195	<b>0,045</b>
HGB [g/dL]	-0,339	<b>0,000</b>
HCT [%]	-0,345	<b>0,000</b>
Fe [μmol/L]	-0,372	<b>0,002</b>
ferrytyna [ng/mL]	0,491	<b>0,000</b>
triacylglicerole [mg/dL]	0,212	<b>0,041</b>
całkowity cholesterol [mg/dL]	0,238	<b>0,021</b>
HDL-cholesterol [mg/dL]	-0,284	<b>0,008</b>
LDL-cholesterol [mg/dL]	0,314	<b>0,002</b>
albuminy [g/dL]	-0,288	NS
białko całkowite [g/dL]	-0,463	<b>0,000</b>
wapń całkowity [mg/dL]	0,031	NS
iPTH [pg/mL]	0,361	<b>0,005</b>
eGFR [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	-0,299	<b>0,000</b>

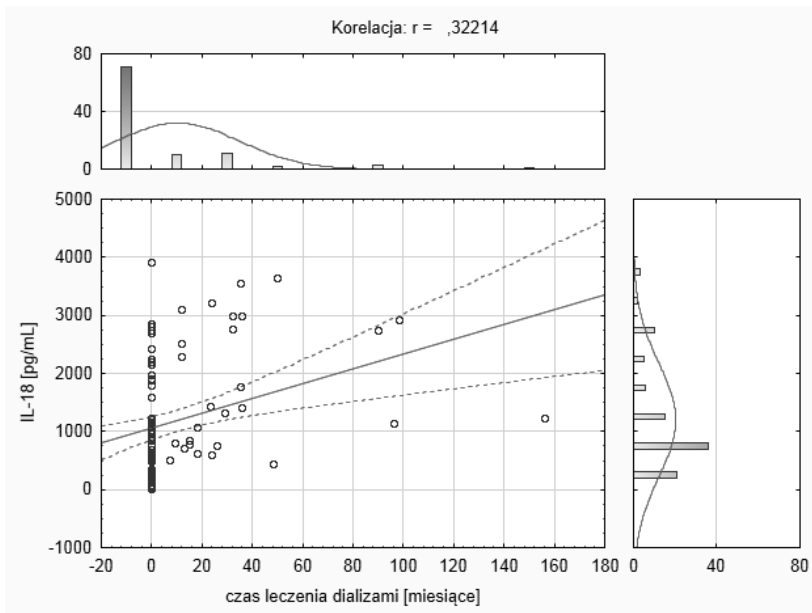
Wyróżniono wartość *P*, gdy korelacje pomiędzy stężeniem IL-18 a wybranym parametrem były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; *r* – współczynnik korelacji Pearsona, NS – oznacza brak istotności statystycznej.

czasu leczenia dializami, grubości blaszki miażdżycowej, leczenia ACEi, poziomu glikemii, stężenia ferrytyny, cholesterolu całkowitego oraz stężenia iPTH. Z kolei odwrotną zależność wykryto pomiędzy stężeniem IL-18 a leczeniem statynami, parametrami morfologii krwi, tj HGB, HCT a także HDL-cholesterolem, stężeniem albumin i białka całkowitego w surowicy krwi oraz wielkością eGFR. Wybrane pary zależności zostały przedstawione na wykresach rozrzutu (Ryciny 24, 25, 26).

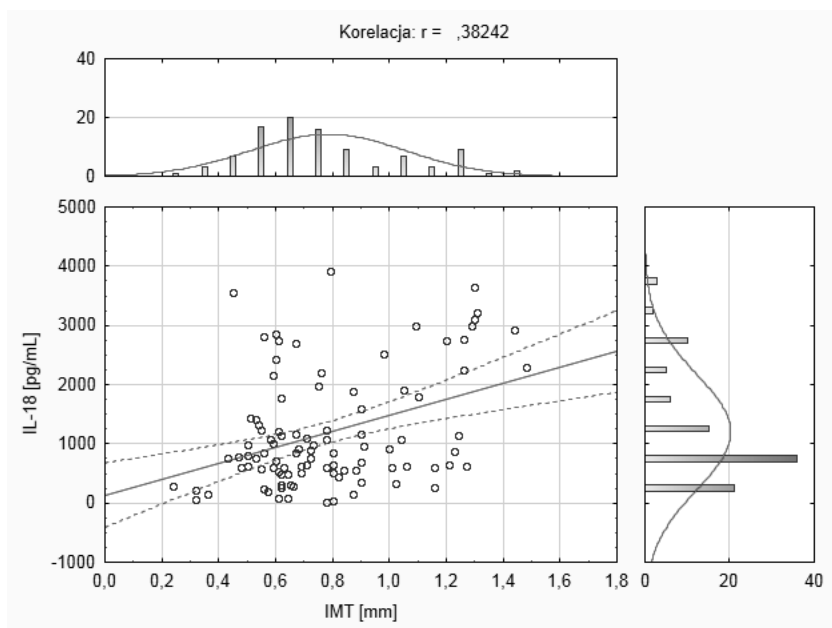
W celu oceny zmienności IL-18 wykonano analizę regresji wieloczynnikowej metodą krokową postępującą, uzyskując model, który tłumaczył zmienność IL-18 w 86,16% ( $R^2 = 86,16\%$ , błąd standardowy estymacji = 332,7,  $P = 0,000$ ). W „najlepszym” modelu znalazły się następujące parametry: CRP, PTH, leczenie statynami, leczenie ACEI, HGB, stężenie całkowitego cholesterolu, wielkość eGFR, cztery spośród nich, tj. CRP, iPTH, leczenie statynami, leczenie ACEI wykazywały statystycznie istotny wpływ na IL-18, odpowiednio  $P = 0,000$ ,  $P = 0,000$ ,  $P = 0,000$  i  $P = 0,002$ . Wyniki analizy zostały przedstawione w tabeli 15.



**Rycina 24.** Wykres rozrzutu wraz z 95% przedziałem ufności (zaznaczonym przerywanymi liniami) i histogramami, przedstawiający ujemną korelację pomiędzy stężeniem IL-18 [pg/ml] a wielkością eGFR [ml/min/1,73m<sup>2</sup>].



**Rycina 25.** Wykres rozrzutu wraz z 95% przedziałem ufności (zaznaczonym przerywanymi liniami) i histogramami, przedstawiający dodatnią korelację pomiędzy stężeniem IL-18 [pg/mL] a czasem leczenia dializami [miesiące].



**Rycina 26.** Wykres rozrzutu wraz z 95% przedziałem ufności (zaznaczonym przerywanymi liniami) i histogramami, przedstawiający dodatnią korelację pomiędzy stężeniem IL-18 [pg/mL] a grubością blaszki miażdżycowej IMT [mm].

Wieloczynnikowa analiza wariancji ANOVA (MANOVA) ujawniła trzy zmienne, tj. IMT, hsCRP i eGFR, które wzięte razem pod uwagę istotnie wpływały na stężenie IL-18 w surowicy krwi ( $P = 0,000$ ,  $F = 4079,6$ , błąd standardowy estymacji = 633,187).

Z kolei przy pomocy metody Kapłana-Meiera oszacowano prawdopodobieństwo przeżycia. Ci spośród chorych dializowanych, tj. chorych z grupy CKD5, którzy charakteryzowali się wyższymi lub równymi medianie wielkościami stężeń IL-18 w surowicy krwi w porównaniu do pozostałych chorych tej grupy, charakteryzowali się obniżoną przeżywalnością (log-rank test,  $P = 0,0036$ ). Wykres funkcji przeżycia w grupie pacjentów dializowanych, w zależności od stężenia IL-18 w surowicy krwi, został przedstawiony na rycinie 27.

Na podstawie wyników zawartych w tabeli przeżycia (Tabela 16) oraz analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa (Tabela 17) można wywnioskować, że chory z podwyższonym stężeniem IL-18 (mediana  $\geq 1411,5$  pg/mL) w surowicy krwi ma zdecydowanie mniejsze szanse na przeżycie w porównaniu z osobą hemodializowaną, która ma stężenia IL-18 niższe (mediana IL-18  $< 1411,5$  pg/mL). I tak na przykład 8 miesięcy przeżyje 92,3% chorych z niższymi stężeniami IL-18, a jedynie 57,1% chorych ze stężeniami wyższymi. Współczynnik hazardu jest równy 1,0009, co oznacza, że ci pacjenci dializowani, którzy charakteryzują

się wyższymi stężeniami IL-18 mają 1,0009 razy wyższe ryzyko zgonu w porównaniu z chorymi dializowanymi, których stężenia IL-18 w surowicy krwi są niższe niż mediana.

**Tabela 15.** Wyniki analizy regresji wieloczynnikowej, w której poszukiwano najlepszego modelu tłumaczącego zmienność IL-18 w surowicy krwi badanych osób

Nr modelu	Zmienna	Współczynnik beta	R	R <sup>2</sup>	P
1	hsCRP	0,728	0,72	0,529	<b>0,000</b>
2	hsCRP	0,649	0,87	0,762	<b>0,000</b>
	iPTH	0,489			<b>0,000</b>
3	hsCRP	0,621	0,90	0,818	<b>0,000</b>
	iPTH	0,38			<b>0,000</b>
	leczenie statynami	0,264			<b>0,000</b>
4	hsCRP	0,607	0,91	0,838	<b>0,000</b>
	iPTH	0,337			<b>0,000</b>
	leczenie statynami	0,266			<b>0,000</b>
	leczenie ACEI	0,150			<b>0,021</b>
5	hsCRP	0,599	0,918	0,843	<b>0,000</b>
	iPTH	0,273			<b>0,003</b>
	leczenie statynami	0,268			<b>0,000</b>
	leczenie ACEI	0,129			<b>0,053</b>
	HGB	-0,111			0,247
6	hsCRP	0,583	0,921	0,849	<b>0,000</b>
	iPTH	0,259			<b>0,000</b>
	leczenie statynami	0,272			<b>0,000</b>
	leczenie ACEI	0,131			<b>0,021</b>
	HGB	-0,121			0,241
	całkowity cholesterol	0,791			0,197
7	hsCRP	0,621	0,928	0,861	<b>0,000</b>
	iPTH	0,307			<b>0,000</b>
	leczenie statynami	0,340			<b>0,000</b>
	leczenie ACEI	0,207			<b>0,002</b>
	HGB	-0,211			0,241
	całkowity cholesterol	0,135			0,197
	eGFR	0,249			<b>0,054</b>

$R = 92,82\%$ ,  $R^2 = 86,16\%$ , błąd standardowy estymacji = 332,7,  $P < 0,000$ . Wyróżniono wartość  $P$ , gdy dany parametr istotnie statystycznie opisywał zmienność IL-18, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ .

**Tabela 16.** Przeżycie w grupie chorych hemodializowanych w zależności od wielkości mediany IL-18

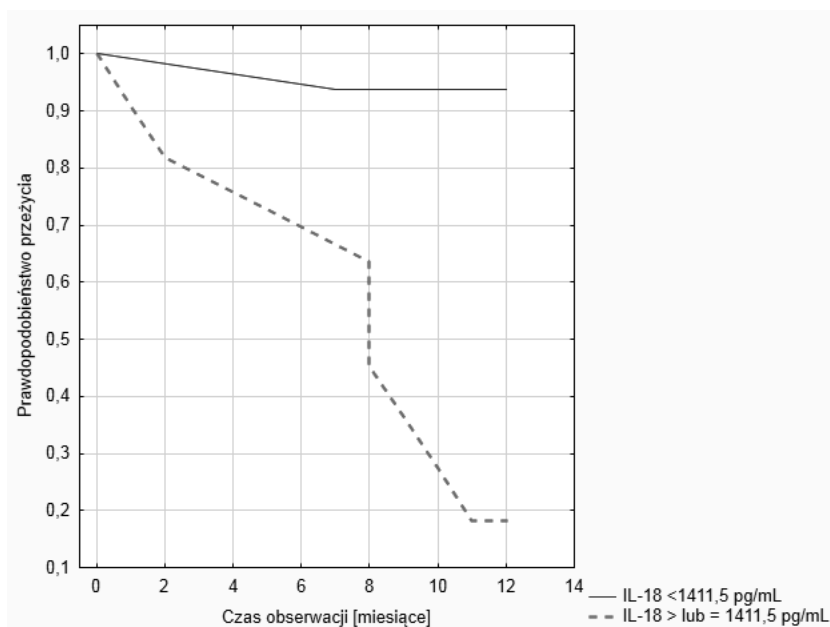
		Przeżycie [miesiące]							
		1	2	5	8	9	10	11	12
IL-18 [pg/mL]	< 1411,5 [pg/mL]	100%			92,3%				
	≥ 1411,5 [pg/mL]	92,8%	85,7%	78,5%	57,1%	50%	42%	35,7%	



**Tabela 17.** Przedstawienie wyników regresji proporcjonalnego hazardu Coxa dla IL-18

Regresja proporcjonalnego hazardu Coxa Chi2 = 9,966, P = 0,0016									
Zmienna	Beta	Błąd standardowy	Beta 95% dolna	Beta 95% górna	Wart t	Wald Statyst.	P	HR	95% CI
IL-18	0,00	0,00	0,00	0,00	2,88	8,31	0,004	1,0009	1,0009–1,001

95% CI – 95% przedział ufności, HR – współczynnik hazardu.



**Rycina 27.** Wykres funkcji przeżycia chorych hemodializowanych w zależności od wielkości stężenia IL-18 w surowicy. Wielkość grupująca dla IL-18 została dobrana w oparciu o wyliczoną medianę IL-18 dla całej grupy CKD5 = 1411,5. Linia ciągła jest charakterystyczna dla chorych grupy CKD5, których stężenia IL-18 w surowicy krwi były niższe od mediany. Z kolei linia przerywana ukazuje kumulowaną proporcję przeżycia dla chorych, których stężenie IL-18 w surowicy krwi było wyższe lub równe medianie. Różnice pomiędzy grupami były istotne statystycznie (test Log-rank)  $P = 0,0036$ .

### Wysokie czułe białko C-reaktywne (hsCRP)

Stężenie hsCRP było we wszystkich badanych grupach zbliżone (Rycina 27) i nie różniło się znamienne statystycznie pomiędzy grupami. Jedyna różnica, która była statystycznie istotna, dotyczyła grup CKD5B i HV. Chorzy hemodializowani z grupy CKD5B charakteryzowali się wyższymi stężeniami hsCRP w porównaniu z osobami HV, co zostało przedstawione na rycinie 28.

Analiza zależności pomiędzy hsCRP a wybranymi parametrami (Tabela 18) ujawniła istnienie dodatnich korelacji pomiędzy stężeniem hsCRP w surowicy krwi a nadciśnieniem tętniczym, czasem leczenia HD, grubością blaszki miażd-

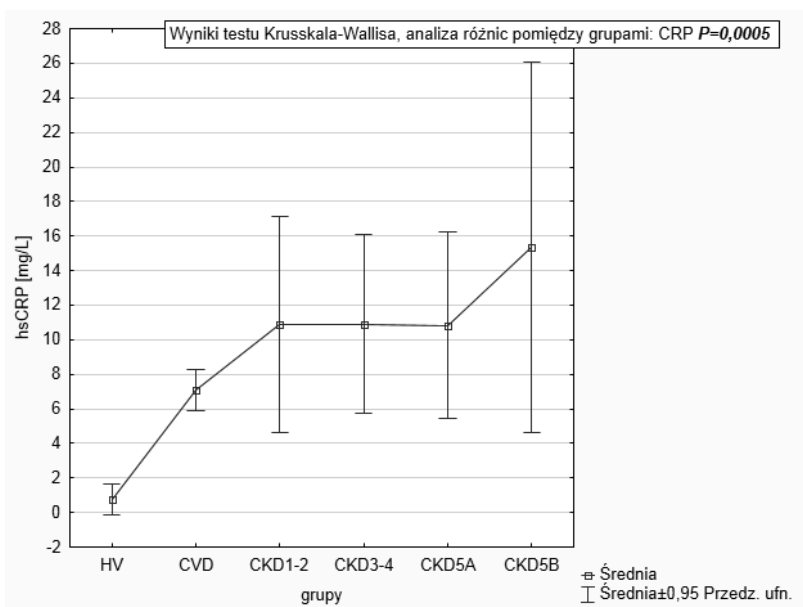
dżycowej oraz stężeniem ferrytyny. Z kolei odwrotne zależności odnotowano pomiędzy stężeniem hsCRP a leczeniem statynami i ACEI, stężeniem żelaza w surowicy krwi, stężeniem albumin, białka całkowitego oraz wielkością eGFR. Nie zaobserwowano natomiast istotnych zależności pomiędzy wielkością hsCRP a adekwatnością dializ, glikemią, stężeniem hemoglobiny, wielkością HCT, profilem lipidowym, stężeniem wapnia całkowitego oraz PTH.

**Tabela 18.** Jednoczynnikowa analiza korelacji pomiędzy stężeniem hsCRP w surowicy krwi a wybranymi parametrami

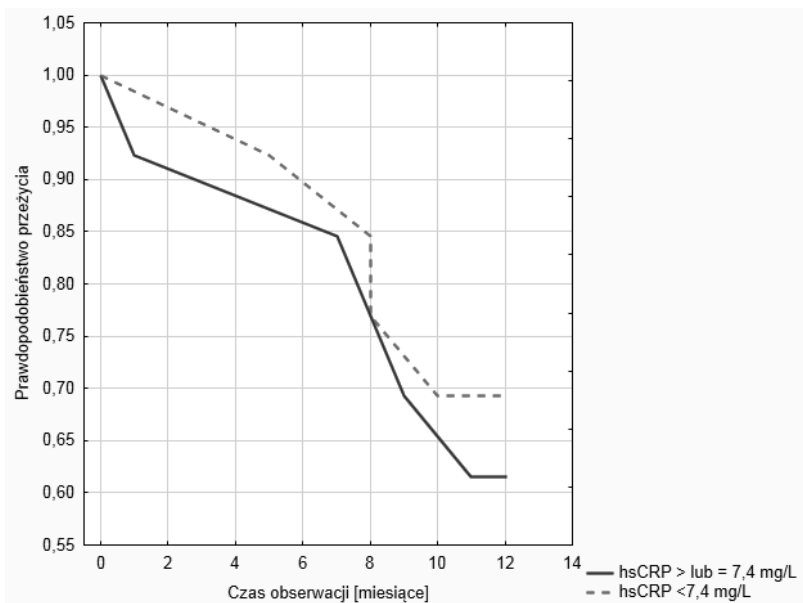
Parametr	r	P
nadciśnienie tętnicze	0,22	<b>0,03</b>
czas leczenia dializami [miesiące]	0,26	<b>0,01</b>
adekwatność dializy	0,129	NS
IMT [mm]	0,40	<b>0,000</b>
leczenie statynami	-0,236	<b>0,021</b>
leczenie ACEI	-0,419	<b>0,041</b>
glukoza [mg/dL]	0,08	NS
HGB [g/dL]	-0,20	NS
HCT [%]	-0,21	NS
Fe [ $\mu$ mol/L]	-0,385	<b>0,006</b>
ferrytyna [ng/mL]	0,490	<b>0,000</b>
triacylglicerole [mg/dL]	-0,08	NS
całkowity cholesterol [mg/dL]	-0,07	NS
HDL cholesterol [mg/dL]	-0,22	NS
LDL cholesterol [mg/dL]	0,10	NS
albuminy [g/dL]	-0,327	<b>0,028</b>
białko całkowite [g/dL]	-0,453	<b>0,000</b>
wapń całkowity [mg/dL]	0,019	NS
iPTH [pg/mL]	0,098	NS
eGFR [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	-0,299	<b>0,000</b>

Wyróżniono wartość *P*, gdy korelacje pomiędzy stężeniem hsCRP a wybranym parametrem były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; *r* – współczynnik korelacji Pearsona, NS – oznacza brak istotności statystycznej.

Za pomocą metody Kaplana-Meiera oszacowano prawdopodobieństwo przeżycia. Podzielono chorych z grupy CKD5 w zależności od stężenia hsCRP na dwie grupy, tj. jedna ze stężeniami mniejszymi od mediany (wyliczonej dla całej grupy CKD5 = 7,4 mg/L), druga – chorzy wykazujący stężenia wyższe lub równe medianie. Okazało się, że nie było istotnych różnic pomiędzy grupami odnośnie do prawdopodobieństwa przeżycia (test log rank  $P = 0,67$ ), co zostało zobrazowane na rycinie 29.



Rycina 28. Zmiany stężeń hsCRP w badanych grupach.



Rycina 29. Wykres funkcji przeżycia chorych hemodializowanych w zależności od wielkości stężenia hsCRP w surowicy. Wielkość grupująca dla hsCRP została dobrana w oparciu o wyliczoną medianę stężeń hsCRP dla całej grupy CKD5 = 7,4. Linia przerywana jest charakterystyczna dla chorych CKD5, których stężenia hsCRP były niższe od mediany. Z kolei linia ciągła ukazuje kumulowaną proporcję przeżycia dla chorych, których stężenia hsCRP były wyższe lub równe medianie. Różnice pomiędzy grupami były nieistotne statystycznie (test log-rank)  $P = 0,67$ .

### 6.1.3. Stres oksydacyjny

W celu oceny poziomu stresu oksydacyjnego oznaczono następujące parametry: stężenie metaloproteinazy 9 (MMP-9), tkankowego inhibitora metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (TIMP-1), paraoksonazy 1 (PON-1), asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA), mieloperoksydazy (MPO) oraz obliczono wskaźnik MMP-9/TIMP-1. Wyniki zbiorczej analizy tych parametrów, wraz z zaznaczeniem istotnych statystycznie różnic obserwowanych pomiędzy grupami, zostały przedstawione w tabeli 19.

**Tabela 19.** Porównanie stanu stresu oksydacyjnego w różnych grupach badawczych

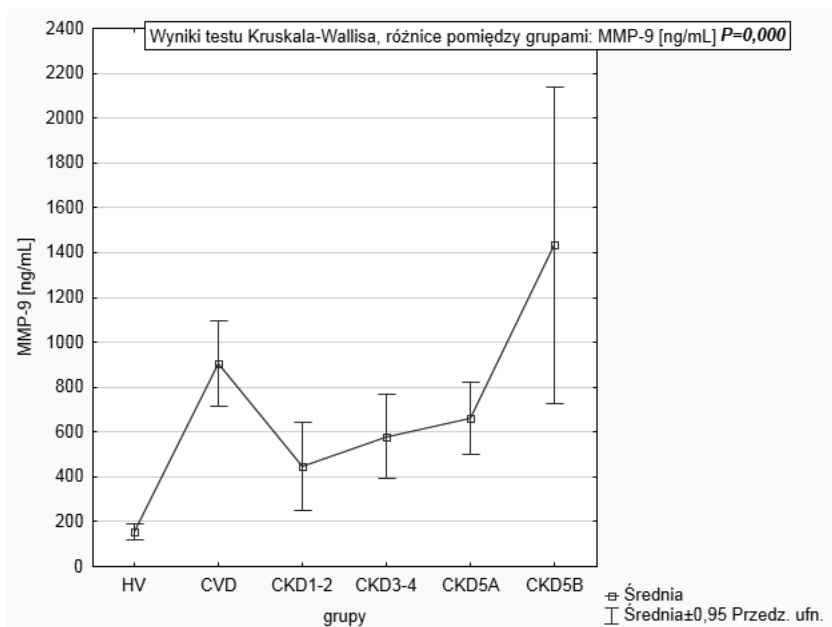
Zmienna	HV	CVD	Grupa pacjentów z PChN				P*
			CKD			P*	
			CKD1-2	CKD3-4	CKD5		
		CKD5A			CKD5B		
MMP-9 [ng/mL]	167,98 ± 53,28	885,15 ± 422,55	396,65 ± 412,94	434,16 ± 314,66	1089,77 ± 805,42		0,000
					695,08 ± 300,08	1394,00 ± 930,96	0,000
TIMP-1 [ng/mL]	129,23 ± 57,07	168,23 ± 30,16	182,00 ± 27,17	203,92 ± 50,01	188,10 ± 59,66		0,000
					208,20 ± 57,49	172,61 ± 56,61	0,000
MMP-9/TIMP-1	1,25 ± 0,30	5,29 ± 2,16	2,11 ± 1,69	2,22 ± 1,0	6,66 ± 5,06		0,000
					3,48 ± 1,51	9,11 ± 4,029	0,000
PON-1 [µg/mL]	2,87 ± 0,34	2,87 ± 0,34	1,34 ± 0,27	0,43 ± 0,31	0,06 ± 0,06		0,000
					0,11 ± 0,06	0,03 ± 0,02	0,001
ADMA [µmol/L]	0,72 ± 0,15	0,72 ± 0,15	0,92 ± 0,26	1,47 ± 0,26	2,03 ± 0,50		0,000
					1,58 ± 0,28	2,36 ± 0,355	0,000
MPO [µg/L]	178,88 ± 82,21	1120,85 ± 757,62	417,49 ± 432,91	1107,81 ± 632,11	2381,92 ± 1048,13		0,000
					2224,38 ± 1278,83	2503,35 ± 806,83	0,000

Wyniki przedstawione jako średnia ± SD. Dla porównań pomiędzy wszystkimi grupami stosowano test Kruskala-Wallis. \*Wyróżniono wartość P, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ .

#### Metaloproteinaza 9 (MMP-9)

Najwyższe stężenie MMP-9 w surowicy krwi wykazywali chorzy hemodializowani grupy CKD5B. Różnili się oni pod tym względem w porównaniu z osobami grupy HV oraz CKD1-2 i CKD3-4. Na podstawie analizy wyników przedstawionych na rycinie 30. oraz zamieszczonych w tabeli 20. można zauważyć, że różnice między wszystkimi grupami analizowanymi łącznie w zakresie stężeń MMP-9 w surowicy były statystycznie istotne. Wynikało to w głównej mierze ze

znamiennych różnic pomiędzy grupami HV i grupami CVD, CKD3-4, CKD5A i CKD5B. We wszystkich tych grupach stężenia MMP-9 w surowicy krwi były wyższe w porównaniu do HV. Pacjenci grupy CVD mieli podobne (nie różniące się znacząco statystycznie) stężenia MMP-9 w porównaniu z pacjentami CKD3-4, CKD5A, CKD5B. Jednocześnie zauważalna była tendencja narastania stężenia MMP-9 w miarę upośledzenia funkcji nerek. Ponadto, nie odnotowano różnic pomiędzy grupami CKD5A i CKD5B.



Rycina 30. Zmiany stężeń MMP-9 w surowicy krwi w badanych grupach.

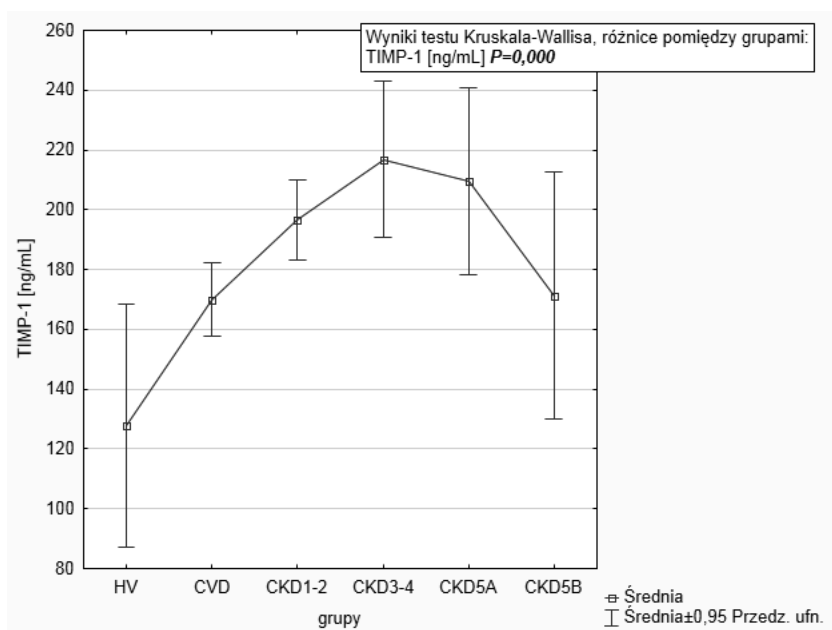
Tabela 20. Przedstawienie wartości P dla porównań wielokrotnych (dwustronnych) dla zmiennej zależnej MMP-9

MMP-9 [ng/mL]	HV	CVD	CKD1-2	CKD3-4	CKD5A	CKD5B
HV		<b>0,000</b>	NS	<b>0,020</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
CVD	<b>0,000</b>		<b>0,0026</b>	NS	NS	NS
CKD1-2	NS	<b>0,0026</b>		NS	NS	<b>0,001</b>
CKD3-4	<b>0,020</b>	NS	NS		NS	<b>0,019</b>
CKD5A	<b>0,000</b>	NS	NS	NS		NS
CKD5B	<b>0,000</b>	NS	<b>0,001</b>	<b>0,019</b>	NS	

Wyróżniono wartość P, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; NS – oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie analizowanego parametru. Analizę przeprowadzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa.

### Tkankowy inhibitor metaloproteinaz-1 (TIMP-1)

Najwyższymi stężeniami TIMP-1 w surowicy krwi charakteryzowali się pacjenci z grupy CKD3-4, którzy w analizie porównawczej grup statystycznie istotnie różnili się pod względem tych stężeń w porównaniu z grupami HV oraz CVD. Na podstawie analizy wyników zamieszczonych w tabeli 19., tabeli 21. oraz na rycinie 31. widać wyraźnie, że stężenie TIMP-1 wzrastało w miarę narastania upośledzenia czynności nerek aż do etapu przed-dializacyjnego (CKD3-4), a następnie ulegało nieznacznemu obniżeniu u pacjentów leczonych hemodializą. Jednak różnice pomiędzy grupą pacjentów hemodializowanych a pozostałymi



Rycina 31. Zmiany stężeń TIMP-1 w surowicy krwi w badanych grupach.

Tabela 21. Przedstawienie wartości P dla porównań wielokrotnych (dwustronnych) dla zmiennej zależnej TIMP-1

TIMP-1 [ng/mL]	HV	CVD	CKD1-2	CKD3-4	CKD5A	CKD5B
HV		NS	<b>0,018</b>	<b>0,000</b>	<b>0,008</b>	NS
CVD	NS		NS	<b>0,006</b>	NS	NS
CKD1-2	<b>0,018</b>	NS		NS	NS	NS
CKD3-4	<b>0,000</b>	<b>0,006</b>	NS		NS	NS
CKD5A	<b>0,008</b>	NS	NS	NS		NS
CKD5B	NS	NS	NS	NS	NS	

Wyróżniono wartość P, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; NS – oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie analizowanego parametru. Analizę przeprowadzono za pomocą testu Kruskala-Wallis.

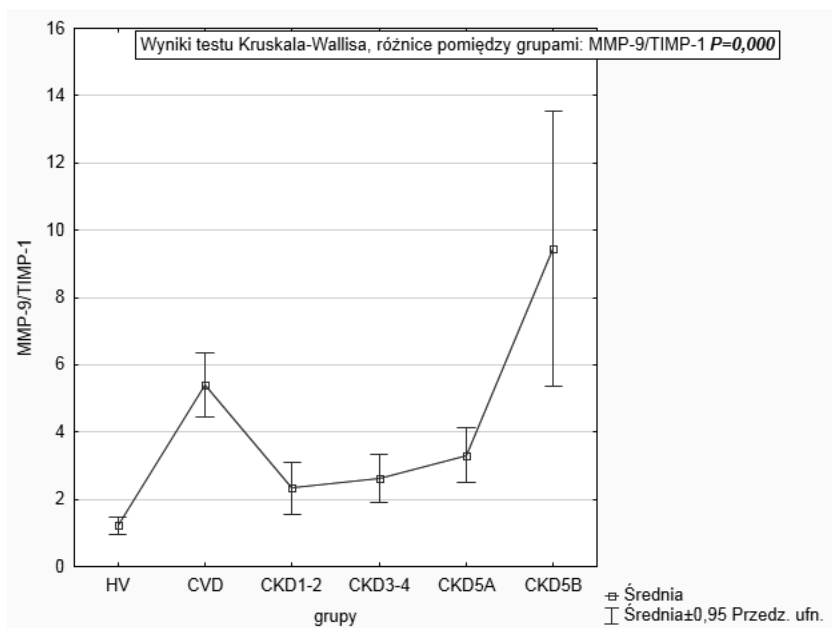
grupami były statystycznie nieistotne z jednym wyjątkiem, tj. różnicą pomiędzy CKD5A a HV. Wyniki analizy porównawczej stężeń TIMP-1 we wszystkich badanych grupach zostały przedstawione na rycinie 30. i w tabeli 21.

### Wielkość wskaźnika MMP-9/TIMP-1

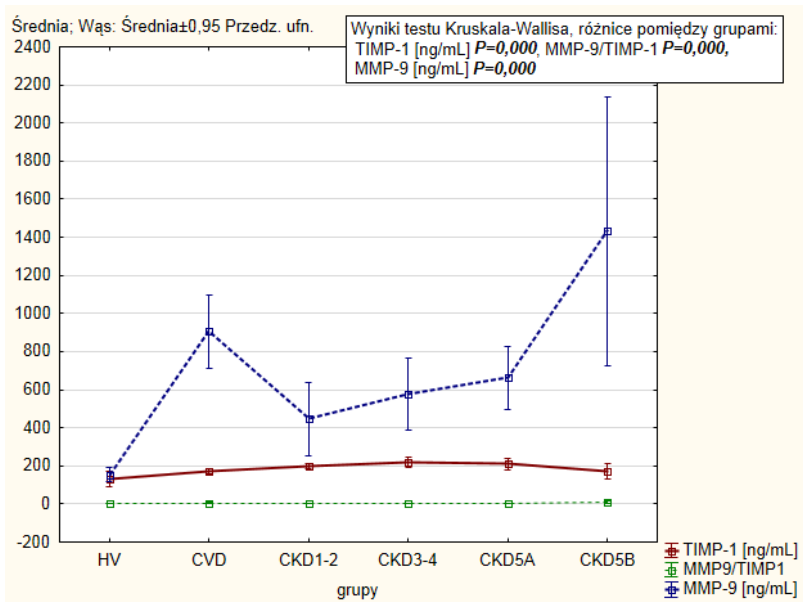
Analiza porównawcza wskaźnika MMP-9/TIMP-1 w badanych grupach wykazała statystycznie istotny wzrost jego wartości wśród pacjentów hemodializowanych, którzy zmarli w czasie rocznej obserwacji. Z kolei istotnie obniżone wartości tego wskaźnika zaobserwowano w grupach CKD1-2 i CKD3-4. Wyniki przedstawiono na rycinie 32., 33. i w tabeli 22.

Zestawienie wyników badań układu MMP-9 i TIMP-1 w badanych grupach zostało przedstawione na rycinie 32. Zauważalne były dwa wyraźne wzrosty stężeń MMP-9. Jeden z nich (mniejszy) dotyczył grupy CVD, a drugi (większy) grupy CKD5B. Przy czym różnice pomiędzy tymi grupami w zakresie stężeń MMP-9 i TIMP-1 były statystycznie nieistotne.

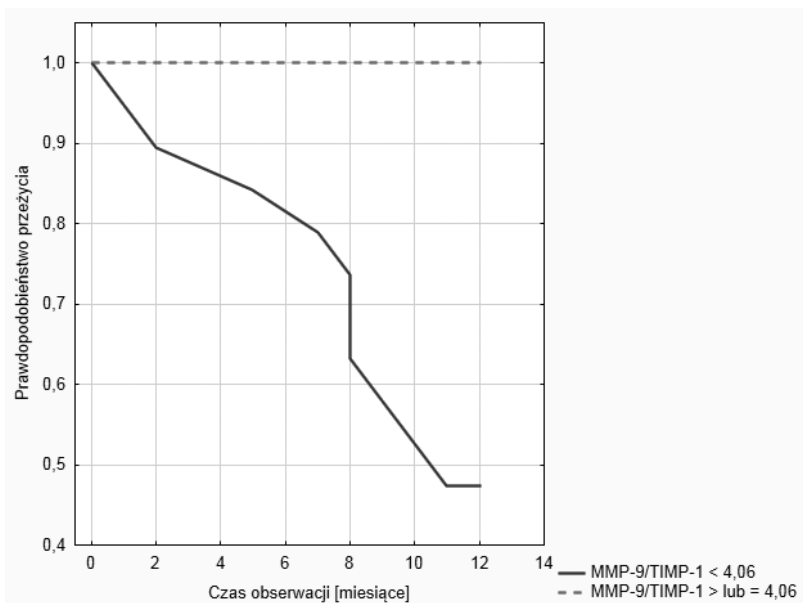
Za pomocą metody Kaplana-Meiera oszacowano prawdopodobieństwo przeżycia. Ci spośród chorych dializowanych, tj. chorych z grupy CKD5, którzy charakteryzowali się wyższymi lub równymi medianie wielkościami wskaźnika MMP-9/TIMP-1 w porównaniu do pozostałych chorych tej grupy, charakteryzowali się obniżoną przeżywalnością (log-rank test,  $P = 0,001$ ). Wykres funkcji przeżycia w grupie pacjentów dializowanych, w zależności od wielkości wskaźnika MMP-9/TIMP-1 został przedstawiony na rycinie 34.



Rycina 32. Zmiany wielkości wskaźnika MMP-9/TIMP-1 w badanych grupach.



Rycina 33. Zestawienie wyników badań układu MMP-9 i TIMP-1 w badanych grupach.



Rycina 34. Wykres funkcji przeżycia chorych hemodializowanych w zależności od wielkości wskaźnika MMP-9/TIMP-1. Wielkość grupująca dla MMP-9/TIMP-1 została dobrana w oparciu o wyliczoną medianę wartości tego wskaźnika dla całej grupy CKD5 = 4,06. Linia przerywana jest charakterystyczna dla chorych grupy CKD5, których wielkość wskaźnika była niższa od mediany. Z kolei linia ciągła ukazuje kumulowaną proporcję przeżycia dla chorych, których wielkość wskaźnika była wyższa lub równa medianie. Różnice pomiędzy grupami były istotne statystycznie (test log-rank)  $P = 0,001$ .



**Tabela 22.** Przedstawienie wartości P dla porównań wielokrotnych (dwustronnych) dla zmiennej zależnej MMP-9/TIMP-1

MMP-9/ TIMP-1	HV	CVD	CKD1-2	CKD3-4	CKD5A	CKD5B
HV		0,000	NS	NS	NS	0,000
CVD	0,000		0,000	0,000	NS	NS
CKD1-2	NS	0,000		NS	NS	0,000
CKD3-4	NS	0,000	NS		NS	0,000
CKD5A	NS	NS	NS	NS		0,04
CKD5B	0,000	NS	0,000	0,000	0,04	

Wyróżniono wartość P, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; NS – oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie analizowanego parametru. Analizę przeprowadzono za pomocą testu Kruskala-Wallis.

Na podstawie wyników zawartych w tabeli przeżycia (Tabela 23) oraz analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa (Tabela 24) można wywnioskować, że chory z podwyższonym wskaźnikiem MMP-9/TIMP-1 (mediana  $\geq 4,06$ ) w surowicy krwi ma zdecydowanie mniejsze szanse na przeżycie w porównaniu z osobą hemodializowaną, która charakteryzuje się niższymi wskaźnikami. I tak na przykład 12 miesięcy przeżyje 100% chorych z niższym wskaźnikiem, a jedynie 47,4% chorych z wyższymi wartościami tego wskaźnika. Współczynnik hazardu jest równy 1,179, co oznacza, że ci pacjenci dializowani, którzy charakteryzują się wyższymi wartościami wskaźnika MMP-9/TIMP-1 mają 1,179 razy wyższe ryzyko zgonu w porównaniu z chorymi dializowanymi, których wartości tego wskaźnika są niższe niż mediana.

**Tabela 23.** Przeżycie w grupie chorych hemodializowanych w zależności od wielkości mediany wskaźnika MMP-9/TIMP-1

		Przeżycie [miesiące]						
		1	2	5	8	9	10	11
MMP-9/ TIMP-1	< 4,06	100%						
	$\geq 4,06$	94,7%	89,5	84,2	61,8%	57,8%	52,6%	47,4%

**Tabela 24.** Przedstawienie wyników regresji proporcjonalnego hazardu Coxa dla wskaźnika MMP-9/TIMP-1

Regresja proporcjonalnego hazardu Coxa Chi2 = 9,119, P = 0,0025									
Zmienna	Beta	Błąd standardowy	Beta 95% dolna	Beta 95% górna	Wart t	Wald Statyst.	P	HR	95% CI
MMP-9/ TIMP-1	0,165	0,049	0,068	0,261	3,33	11,32	0,0007	1,179	1,071–1,298

95% CI – 95% przedział ufności, HR – współczynnik hazardu.

Analiza zależności pomiędzy wskaźnikiem MMP-9/TIMP-1 a wybranymi parametrami (Tabela 25) ujawniła istnienie dodatnich korelacji pomiędzy wielkością badanego wskaźnika a nadciśnieniem tętniczym, czasem leczenia dializami, grubością blaszki miażdżycowej oraz stężeniem ferrytyny. Z kolei odwrotne zależności odnotowano pomiędzy wielkością wskaźnika MMP-9/TIMP-1 a leczeniem statynami i ACEI, glikemią, stężeniem triacylogliceroli, całkowitym cholesterolem, HDL i LDL cholesterolem. Nie zaobserwowano natomiast istotnych zależności pomiędzy wielkością wskaźnika a adekwatnością dializ, stężeniem HGB, wielkością HCT, stężeniem Fe, albumin, białka całkowitego, wapnia całkowitego, iPTH oraz wielkością eGFR.

**Tabela 25.** Jednoczynnikowa analiza korelacji pomiędzy wielkością wskaźnika MMP-9/TIMP-1 w surowicy krwi a wybranymi parametrami

Parametr	r	P
nadciśnienie tętnicze	0,25	<b>0,00</b>
czas leczenia dializami [miesiące]	0,34	<b>0,00</b>
adekwatność dializy	-0,00	NS
IMT [mm]	0,37	<b>0,00</b>
leczenie statynami	-0,24	<b>0,01</b>
leczenie ACEI	-0,23	<b>0,01</b>
glukoza [mg/dL]	0,27	<b>0,00</b>
HGB [g/dL]	-0,07	NS
HCT [%]	-0,15	NS
Fe [ $\mu$ mol/L]	-0,17	NS
ferrytyna [ng/mL]	0,40	<b>0,003</b>
triacyloglicerole [mg/dL]	-0,23	<b>0,04</b>
całkowity cholesterol [mg/dL]	-0,34	<b>0,00</b>
HDL cholesterol [mg/dL]	-0,43	<b>0,00</b>
LDL cholesterol [mg/dL]	-0,24	<b>0,03</b>
albuminy [g/dL]	-0,19	NS
białko całkowite [g/dL]	-0,09	NS
wapń całkowity [mg/dL]	0,01	NS
iPTH [pg/mL]	0,01	NS
eGFR [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	-0,13	NS

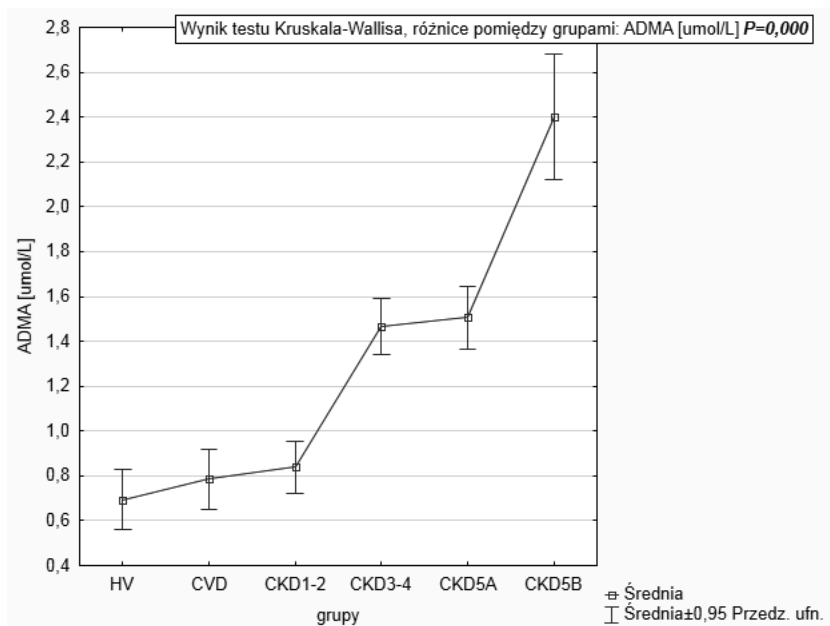
*Wyróżniono wartość P, gdy korelacje pomiędzy wielkością wskaźnika MMP-9/TIMP-1 a wybranym parametrem były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; r – współczynnik korelacji Pearsona, NS – oznacza brak istotności statystycznej.*

W celu oceny zmienności MMP-9/TIMP-1 wykonano analizę regresji wieloczynnikowej metodą krokową postępującą, uwzględniając następujące zmienne: wiek, BMI, nadciśnienie tętnicze, czas leczenia HD, adekwatność dializy, IMT, leczenie statynami, leczenie ACEI, glukoza, HGB, HCT, Fe, ferrytyna, triacyloglicerole, całkowity cholesterol, albuminy, białko całkowite, wapń całkowity, iPTH, eGFR, mocznik i uzyskano model, w którym znalazł się jedynie wiek, który tłu-

maczył zmienność wskaźnika MMP-9/TIMP-1 w 58,2% ( $R^2 = 58,2\%$ , błąd standardowy estymacji = 40,678  $P = 0,000$ ).

### Asymetryczna dimetyloarginina (ADMA)

Na podstawie analizy wyników zebranych w tabeli 19. i przedstawionych na rycinie 35. widać wyraźnie, że najwyższe stężenie ADMA w surowicy krwi wykazywali chorzy z grupy CKD 3-4, CKD5A i CKD5B, choć nie odnotowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy tymi grupami (Tabela 26). Różnice zna-



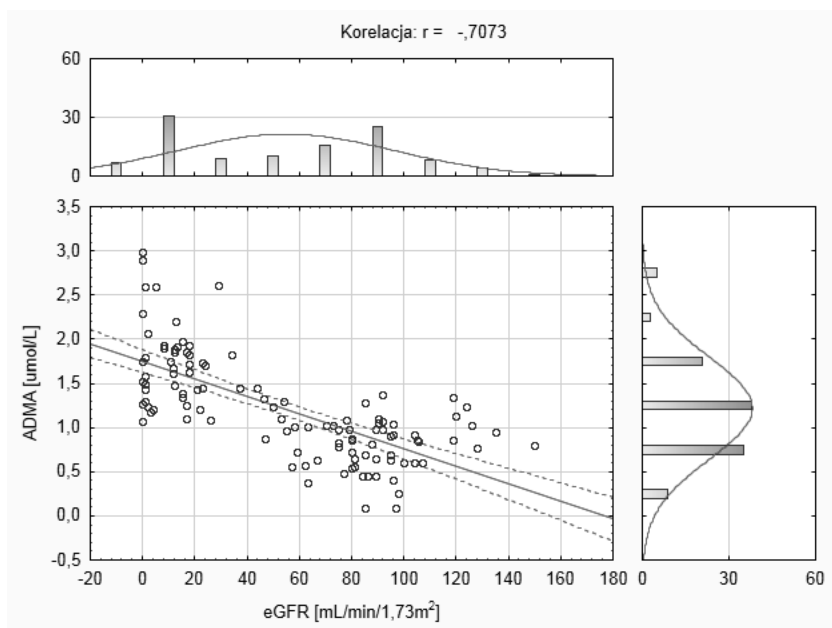
Rycina 35. Zmiany stężeń ADMA w badanych grupach.

Tabela 26. Przedstawienie wartości  $P$  dla porównań wielokrotnych (dwustronnych) dla zmiennej zależnej ADMA

ADMA [µmo/L]	HV	CVD	CKD1-2	CKD3-4	CKD5A	CKD5B
HV		NS	NS	0,000	0,000	0,000
CVD	NS		NS	0,000	0,000	0,000
CKD1-2	NS	NS		0,000	0,000	0,000
CKD3-4	0,000	0,000	0,000		NS	NS
CKD5A	0,000	0,000	0,000	NS		NS
CKD5B	0,000	0,000	0,000	NS	NS	

Wyróżniono wartość  $P$ , gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; NS – oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie analizowanego parametru. Analizę przeprowadzono za pomocą testu Kruskala-Wallis,  $P = 0,0000$ .

mienne statystycznie zaobserwowano pomiędzy grupami HV, CVD a pacjentami z grup CKD3-4, CKD5A i CKD5B. Ogólnie zauważalna była tendencja do wyższych stężeń ADMA wśród pacjentów z wyraźnie zaznaczoną upośledzoną funkcją nerek. Istotna zależność stężeń ADMA od stopnia upośledzenia funkcji nerek ( $P = 0,000$ ,  $r = -0,707$ ) została przedstawiona na rycinie 36.



**Rycina 36.** Wykres rozrzutu wraz histogramami i zaznaczonym przerywanymi liniami 95% przedziałem ufności, przedstawiający ujemną korelację pomiędzy stężeniem ADMA [ $\mu\text{mol/L}$ ] a wielkością eGFR [ $\text{mL/min/1,73m}^2$ ].

Analiza zależności pomiędzy stężeniem ADMA a wybranymi parametrami (Tabela 27) ujawniła istnienie dodatnich korelacji pomiędzy stężeniem ADMA w surowicy krwi a czasem leczenia dializami, grubością blaszki miażdżycowej oraz stężeniem ferrytyny i iPTH. Z kolei odwrotne zależności odnotowano pomiędzy stężeniem ADMA a leczeniem statynami, HGB, HCT, całkowitym cholesterolem, HDL i LDL cholesterolem oraz wielkością eGFR. Nie zaobserwowano natomiast istotnych zależności pomiędzy wielkością ADMA a nadciśnieniem tętniczym, adekwatnością dializ, leczeniem ACEI, glikemią, stężeniem triacylogliceroli, albumin, białka całkowitego i wapnia całkowitego.

Analiza zależności pomiędzy stężeniem ADMA a wybranymi parametrami (Tabela 27) ujawniła istnienie dodatnich korelacji pomiędzy stężeniem ADMA w surowicy krwi a czasem leczenia dializami, grubością blaszki miażdżycowej oraz stężeniem ferrytyny i iPTH. Z kolei odwrotne zależności odnotowano pomiędzy stężeniem ADMA a leczeniem statynami, HGB, HCT, całkowitym chole-

sterolem, HDL i LDL cholesterolem oraz wielkością eGFR. Nie zaobserwowano natomiast istotnych zależności pomiędzy wielkością ADMA a nadciśnieniem tętniczym, adekwatnością dializ, leczeniem ACEI, glikemią, stężeniem triacylogliceroli, albumin, białka całkowitego i wapnia całkowitego.

**Tabela 27.** Jednoczynnikowa analiza korelacji pomiędzy stężeniem ADMA w surowicy krwi a wybranymi parametrami

Parametr	r	P
nadciśnienie tętnicze	-0,14	NS
czas leczenia dializami [miesiące]	0,47	<b>0,00</b>
adekwatność dializy	0,14	NS
IMT [mm]	0,48	<b>0,00</b>
leczenie statynami	-0,20	<b>0,03</b>
leczenie ACEI	-0,02	NS
glukoza [mg/dL]	-0,05	NS
HGB [g/dL]	-0,45	<b>0,00</b>
HCT [%]	-0,49	<b>0,00</b>
Fe [ $\mu$ mol/L]	-0,36	<b>0,00</b>
ferrytyna [ng/mL]	0,59	<b>0,00</b>
triacylglicerole [mg/dL]	-0,18	NS
całkowity cholesterol [mg/dL]	-0,26	<b>0,02</b>
HDL cholesterol [mg/dL]	-0,25	<b>0,03</b>
LDL cholesterol [mg/dL]	-0,22	<b>0,04</b>
albuminy [g/dL]	-0,10	NS
białko całkowite [g/dL]	-0,40	NS
wapń całkowity [mg/dL]	0,19	NS
iPTH [pg/mL]	0,55	<b>0,00</b>
eGFR [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	-0,71	<b>0,00</b>

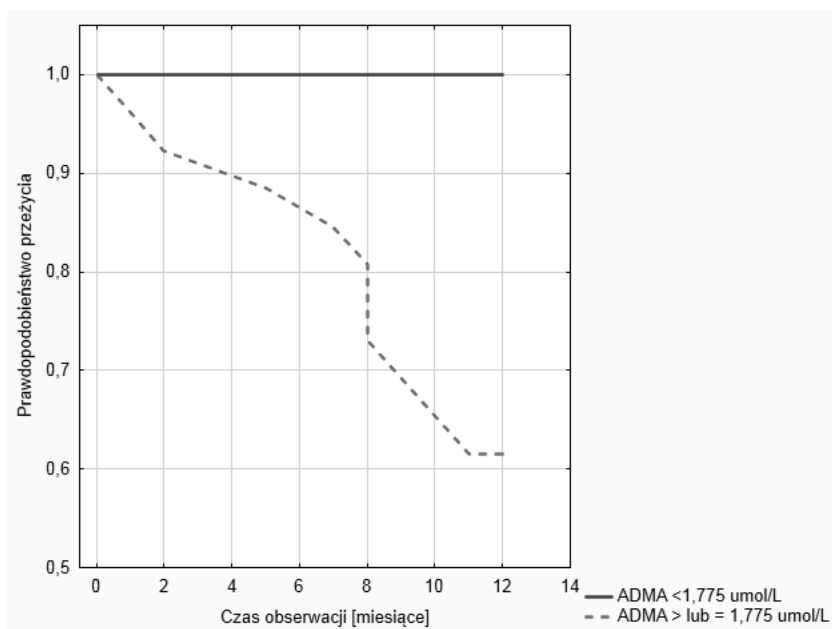
*Wyróżniono wartość P, gdy korelacje pomiędzy stężeniem ADMA a wybranym parametrem były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; r – współczynnik korelacji Pearsona, NS – oznacza brak istotności statystycznej.*

W celu oceny zmienności ADMA wykonano analizę regresji wieloczynnikowej metodą krokową postępującą, uwzględniając następujące zmienne: wiek, BMI, nadciśnienie tętnicze, czas leczenia HD, adekwatność dializy, IMT, leczenia statynami, leczenie ACEI, glukoza, HGB, HCT, Fe, ferrytyna, triacyloglicerole, całkowity cholesterol, albuminy, białko całkowite, wapń całkowity, iPTH, eGFR, mocznik i uzyskano model, w którym znalazł się, podobnie jak to było w przypadku wskaźnika MMP-9/TIMP-1, jedynie wiek, który tłumaczył zmienność ADMA w 10,7% ( $R^2 = 10,7\%$ , błąd standardowy estymacji = 13,0  $P = 0,000$ ).

Za pomocą metody Kaplana-Meiera oszacowano prawdopodobieństwo przeżycia. Ci spośród chorych dializowanych, tj. chorych z grupy CKD5, którzy charakteryzowali się wyższymi lub równymi medianie stężeniami ADMA w surowicy krwi w porównaniu do pozostałych chorych tej grupy, charakteryzowali się

obniżoną przeżywalnością (test log-rank,  $P = 0,001$ ). Wykres funkcji przeżycia w grupie pacjentów dializowanych, w zależności od wielkości stężenia ADMA, został przedstawiony na rycinie 37.

Na podstawie wyników zawartych w tabeli przeżycia (Tabela 28) oraz analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa (Tabela 29) można wywnioskować, że chory z podwyższonym stężeniem ADMA (mediana  $\geq 1,775$ ) w surowicy krwi ma zdecydowanie mniejsze szanse na przeżycie w porównaniu z osobą hemodializowaną, która charakteryzuje się niższymi stężeniami. I tak na przykład 12 miesięcy przeżyje 100% chorych z niższym stężeniem ADMA, a jedynie 61,5% chorych z wyższymi stężeniami ADMA. Współczynnik hazardu jest równy 3,95,



**Rycina 37.** Wykres funkcji przeżycia chorych hemodializowanych w zależności od wielkości stężenia ADMA. Wielkość grupująca dla ADMA została dobrana w oparciu o wyliczoną medianę wartości tego wskaźnika dla całej grupy CKD5 = 1,775  $\mu\text{mol/L}$ . Linia ciągła jest charakterystyczna dla chorych grupy CKD5, których wielkość wskaźnika była niższe od mediany. Z kolei linia przerywana ukazuje kumulowaną proporcję przeżycia dla chorych, których stężenia ADMA były wyższe lub równe medianie. Różnice pomiędzy grupami były istotne statystycznie (test log-rank)  $P = 0,001$ .

**Tabela 28.** Przeżycie w grupie chorych hemodializowanych w zależności od wielkości mediany ADMA

		Przeżycie [miesiące]						
		1	2	5	8	9	10	11
ADMA [umol/L]	< 1,775	100%						
	$\geq 1,775$	96,1%	92,3	88,4	76,9%	69,2%	65,3%	61,5%

**Tabela 29.** Przedstawienie wyników regresji proporcjonalnego hazardu Coxa dla ADMA

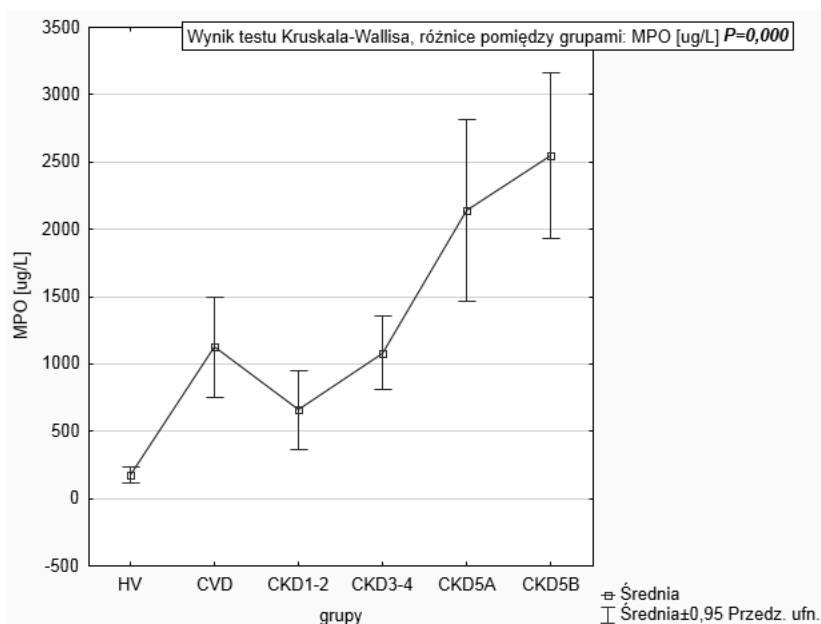
Regresja proporcjonalnego hazardu Coxa Chi2 = 7,98, P = 0,005									
Zmienna	Beta	Błąd standardowy	Beta 95% dolna	Beta 95% górna	Wart t	Wald Statyst.	P	HR	95% CI
ADMA	1,37	0,82	-0,23	2,97	1,67	2,81	0,01	3,95	0,79–19,65

95% CI – 95% przedział ufności, HR – współczynnik hazardu.

co oznacza, że ci pacjenci dializowani, którzy charakteryzowali się wyższymi stężeniami ADMA wykazywali 3,95 razy wyższe ryzyko zgonu w porównaniu z chorymi dializowanymi, których stężenia ADMA były niższe od mediany wyznaczonej dla całej grupy CKD5.

### Mieloperoksydaza (MPO)

Najwyższymi stężeniami MPO w surowicy krwi charakteryzowali się chorzy z grupy CKD5B, choć nie było statystycznie istotnych różnic między grupami pacjentów hemodializowanych. Pacjenci z grupy CVD mieli zauważalnie wyższe stężenia MPO w porównaniu do osób HV i CKD1-2, lecz nie różniły się one znamienne statystycznie w stosunku do wyników uzyskanych w grupach CKD3-4 oraz CKD5B. Widać natomiast było tendencję zmian stężenia MPO w zależności od stopnia upośledzenia funkcji nerek (CKD5B-CKD5B>CKD3-4>CKD1-2). Wyniki zostały przedstawione na rycinie 38. i w tabeli 28. Istnienie zależności pomiędzy stężeniem MPO a wielkością



**Rycina 38.** Zmiany stężeń MPO w badanych grupach.

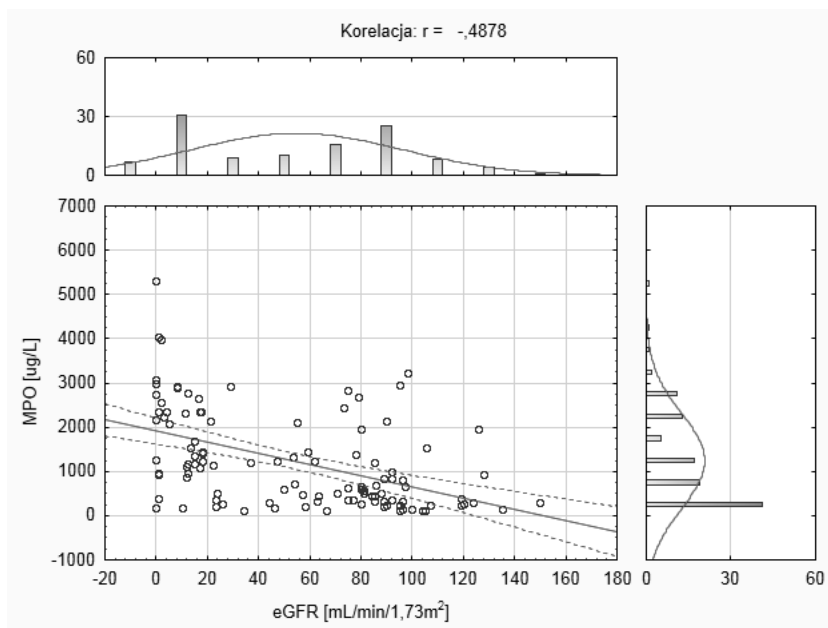
eGFR potwierdzono wykrywając odwrotną, statystycznie istotną, zależność pomiędzy tymi parametrami ( $P = 0,000$ ,  $r = -0,48$ ), która została przedstawiona na rycinie 39.

Analiza zależności pomiędzy stężeniem MPO a wybranymi parametrami (Tabela 29) ujawniła istnienie dodatnich korelacji pomiędzy stężeniem

**Tabela 28.** Przedstawienie wartości  $P$  dla porównań wielokrotnych (dwustronnych) dla zmiennej zależnej MPO

MPO [ $\mu\text{g/L}$ ]	HV	CVD	CKD1-2	CKD3-4	CKD5A	CKD5B
HV		<b>0,003</b>	NS	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
CVD	<b>0,003</b>		NS	NS	NS	<b>0,003</b>
CKD1-2	NS	NS		NS	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>
CKD3-4	<b>0,003</b>	NS	NS		NS	<b>0,022</b>
CKD5A	<b>0,000</b>	NS	<b>0,002</b>	NS		NS
CKD5B	<b>0,000</b>	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>	<b>0,022</b>	NS	

Wyróżniono wartość  $P$ , gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; NS – oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie analizowanego parametru. Analizę przeprowadzono za pomocą testu Kruskala-Wallis.



**Rycina 39.** Wykres rozrzutu wraz histogramami i zaznaczonymi przerwany liniami 95% przedziałem ufności przedstawiający ujemną korelację pomiędzy stężeniem MPO [ $\mu\text{g/L}$ ] a wielkością eGFR [ $\text{mL/min/1,73m}^2$ ].



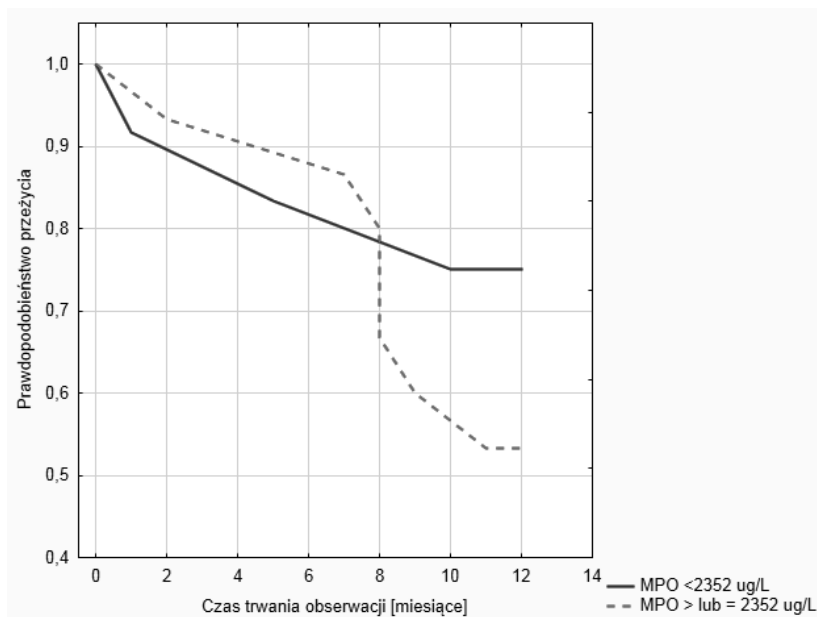
MPO w surowicy krwi a czasem leczenia dializami, grubością blaszki miażdżycowej oraz stężeniem ferrytyny. Z kolei odwrotne zależności odnotowano pomiędzy stężeniem MPO a leczeniem ACEI, HGB, HCT, Fe, całkowitym cholesterolem, HDL i LDL cholesterolem, stężeniem albumin oraz wielkością eGFR. Nie zaobserwowano natomiast istotnych zależności pomiędzy wielkością MPO a nadciśnieniem tętniczym, adekwatnością dializ, leczeniem statynami, glikemią, stężeniem triacylogliceroli, białka całkowitego, wapnia całkowitego i iPTH.

Za pomocą metody Kaplana-Meiera oszacowano prawdopodobieństwo przeżycia. Podzielono chorych z grupy CKD5 w zależności o stężenia MPO na dwie grupy, tj. jedna ze stężeniami mniejszymi od mediany (wyliczonej dla całej grupy CKD5 = 2352 µg/L), druga to chorzy wykazujący stężenia wyższe lub równie medianie. Okazało się, że nie było istotnych różnic pomiędzy grupami odnośnie do prawdopodobieństwa przeżycia (test log rank  $P = 0,31$ ), co zostało przedstawione na rycinie 40.

**Tabela 29.** Jednoczynnikowa analiza korelacji pomiędzy stężeniem MPO w surowicy krwi a wybranymi parametrami

Parametr	r	P
nadciśnienie tętnicze	0,18	NS
czas leczenia dializami [miesiące]	0,45	<b>0,00</b>
adekwatność dializy	-0,02	NS
IMT [mm]	0,30	<b>0,00</b>
leczenie statynami	-0,06	NS
leczenie ACEI	-0,19	<b>0,04</b>
glukoza [mg/dL]	0,05	NS
HGB [g/dL]	-0,28	<b>0,00</b>
HCT [%]	-0,31	<b>0,00</b>
Fe [µmol/L]	-0,31	<b>0,03</b>
ferrytyna [ng/mL]	0,34	<b>0,01</b>
triacyloglicerole [mg/dL]	0,00	NS
całkowity cholesterol [mg/dL]	-0,22	<b>0,05</b>
HDL cholesterol [mg/dL]	-0,29	<b>0,017</b>
LDL cholesterol [mg/dL]	-0,22	<b>0,05</b>
albuminy [g/dL]	-0,33	<b>0,02</b>
białko całkowite [g/dL]	-0,20	NS
wapń całkowity [mg/dL]	-0,08	NS
iPTH [pg/mL]	0,18	NS
eGFR [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	-0,48	<b>0,00</b>

Wyróżniono wartość  $P$ , gdy korelacje pomiędzy stężeniem MPO a wybranym parametrem były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ;  $r$  – współczynnik korelacji Pearsona, NS – oznacza brak istotności statystycznej.

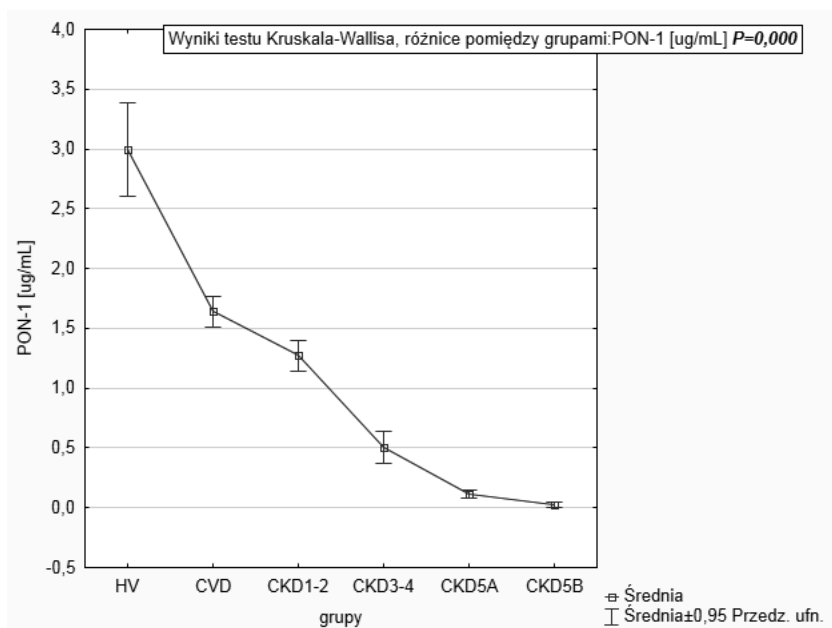


**Rycina 40.** Wykres funkcji przeżycia chorych hemodializowanych w zależności od wielkości stężenia MPO. Wielkość grupująca dla MPO została dobrana w oparciu o wyliczoną medianę stężenia MPO dla całej grupy CKD5 = 2352 µg/L. Linia ciągła jest charakterystyczna dla chorych grupy CKD5, których stężenia były niższe od mediany. Z kolei linia przerywana ukazuje kumulowaną proporcję przeżycia dla chorych, których stężenia były wyższe lub równe medianie. Różnice pomiędzy grupami były nieistotne statystycznie (test log-rank)  $P = 0,31$ .

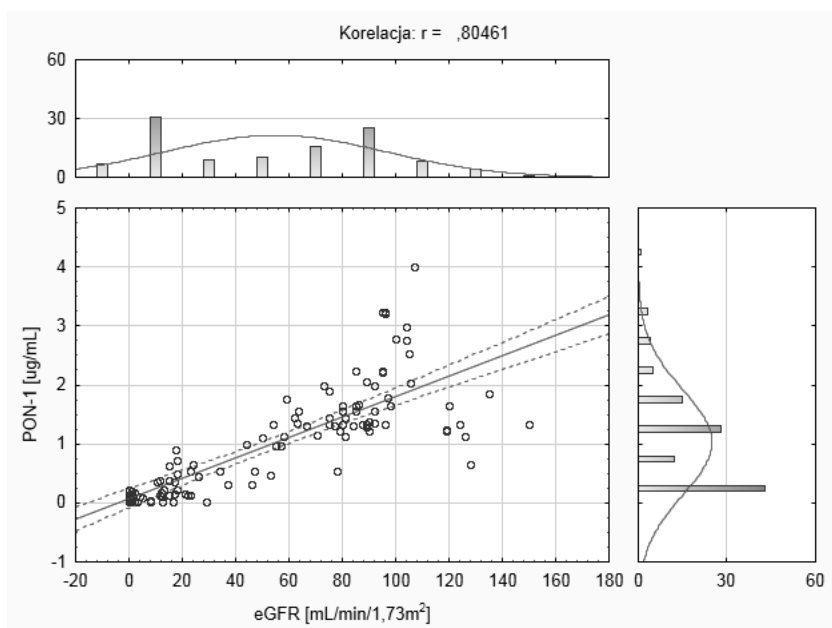
### Paraoksonaza-1 (PON-1)

Stężenie PON-1 w surowicy badanych osób obniżało się zdecydowanie w miarę narastania progresji nerek, co zostało pokazane na rycinie 41. i w tabeli 30. Istotna statystycznie dodatnia korelacja ( $P = 0,00$ ,  $r = 0,80$ ) pomiędzy wielkością eGFR a stężeniem PON-1 potwierdza istnienie tej zależności (Rycina 42). Najniższe stężenia PON-1 obserwowano wśród chorych hemodializowanych. Z kolei na wczesnych etapach choroby nerek (CKD1-2) obserwowano podobne stężenia PON-1 w grupach CKD1-2 i CVD.

Analiza zależności pomiędzy stężeniem PON-1 a wybranymi parametrami (Tabela 31) ujawniła istnienie dodatnich korelacji pomiędzy stężeniem PON-1 w surowicy krwi a HGB, HCT, Fe, HDL-cholesterolem, białkiem całkowitym i wielkością eGFR. Z kolei odwrotne zależności odnotowano pomiędzy stężeniem PON-1 a nadciśnieniem tętniczym, czasem leczenia dializami, grubością blaszki miażdżycowej, stężeniem ferrytyny oraz stężeniem iPTH. Nie zaobserwowano natomiast istotnych zależności pomiędzy wielkością PON-1 a adekwatnością dializ, leczeniem statynami, leczeniem ACEI, glikemią, stężeniem triacylogliceroli, całkowitego cholesterolu, LDL-cholesterolu, stężeniem albumin oraz wapnia całkowitego.



Rycina 41. Zmiany stężeń PON-1 w badanych grupach.



Rycina 42. Wykres rozrzutu wraz histogramami i zaznaczonym przerywanymi liniami 95% przedziałem ufności, przedstawiający dodatnią korelację pomiędzy stężeniem PON-1 [ug/mL] a wielkością eGFR [mL/min/1,73m<sup>2</sup>].

**Tabela 30.** Przedstawienie wartości *P* dla porównań wielokrotnych (dwustronnych) dla zmiennej zależnej PON-1

PON-1 [μmol/mL]	HV	CVD	CKD1-2	CKD3-4	CKD5A	CKD5B
HV		NS	<b>0,03</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
CVD	NS		NS	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
CKD1-2	<b>0,03</b>	NS		<b>0,04</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
CKD3-4	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>		NS	NS
CKD5A	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	NS		NS
CKD5B	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	NS	NS	

Wyróżniono wartość *P*, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; NS – oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie analizowanego parametru. Analizę przeprowadzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa.

**Tabela 31.** Jednoczynnikowa analiza korelacji pomiędzy stężeniem PON-1 w surowicy krwi a wybranymi parametrami

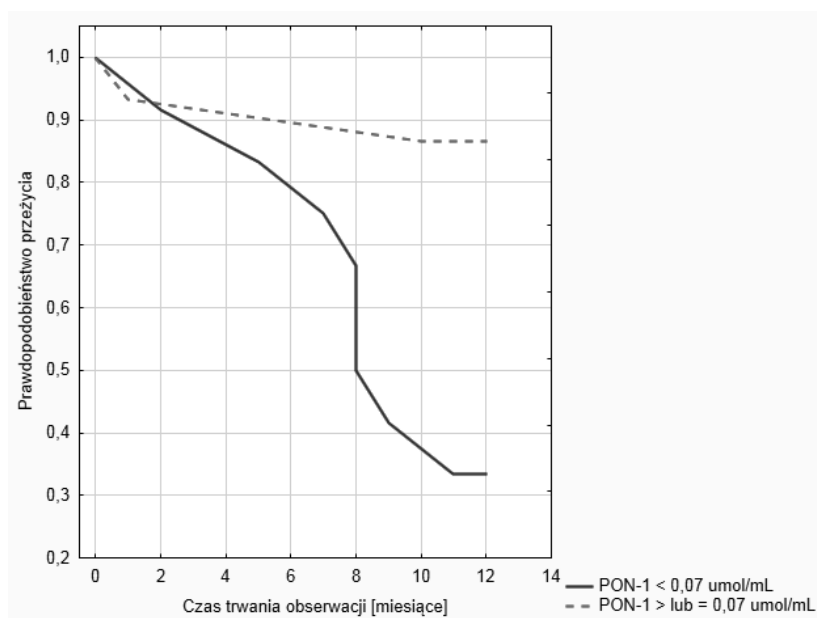
Parametr	r	P
nadciśnienie tętnicze	-0,25	<b>0,007</b>
czas leczenia dializami [miesiące]	-0,42	<b>0,00</b>
adekwatność dializy	0,09	NS
IMT [mm]	-0,43	<b>0,00</b>
leczenie statynami	0,078	NS
leczenie ACEI	-0,00	NS
glukoza [mg/dL]	0,06	NS
HGB [g/dL]	0,55	<b>0,00</b>
HCT [%]	0,59	<b>0,00</b>
Fe [μmol/L]	0,63	<b>0,00</b>
ferrytyna [ng/mL]	-0,436	<b>0,00</b>
triacylglicerole [mg/dL]	0,09	NS
całkowity cholesterol [mg/dL]	0,16	NS
HDL cholesterol [mg/dL]	0,29	<b>0,01</b>
LDL cholesterol [mg/dL]	0,03	NS
albuminy [g/dL]	0,11	NS
białko całkowite [g/dL]	0,43	<b>0,00</b>
wapń całkowity [mg/dL]	-0,15	NS
iPTH [pg/mL]	-0,57	<b>0,00</b>
eGFR [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	0,80	<b>0,00</b>

Wyróżniono wartość *P*, gdy korelacje pomiędzy stężeniem PON-1 a wybranym parametrem były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; *r* – współczynnik korelacji Pearsona, NS – oznacza brak istotności statystycznej.

Za pomocą metody Kaplana-Meiera oszacowano prawdopodobieństwo przeżycia. Ci spośród chorych dializowanych, tj. chorych z grupy CKD5, którzy charakteryzowali się niższymi od mediany stężeniami PON-1 w surowicy krwi w porównaniu do pozostałych chorych tej grupy, charakteryzowali się obniżo-

ną przeżywalnością (test log-rank,  $P = 0,006$ ). Wykres funkcji przeżycia w grupie pacjentów dializowanych, w zależności od wielkości stężenia PON-1, został przedstawiony na rycinie 43.

Na podstawie wyników zawartych w tabeli przeżycia (Tabela 32) oraz analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa (Tabela 33) można wywnioskować, że chory z obniżonym stężeniem PON-1 (mediana  $< 0,07 \mu\text{mol/mL}$ ) w surowicy krwi ma zdecydowanie mniejsze szanse na przeżycie w porównaniu z osobą hemodializowaną, która charakteryzuje się wyższymi stężeniami. I tak na przykład 11 miesięcy przeżyje 86,6% chorych z wyższymi stężeniami PON-1, a jedynie 33,3% chorych z niższymi stężeniami PON-1. Współczynnik hazardu jest równy 6,85, co oznacza, że ci pacjenci dializowani, którzy wykazywali stężenia PON-1



**Rycina 43.** Wykres funkcji przeżycia chorych hemodializowanych w zależności od wielkości stężenia PON-1. Wielkość grupująca dla PON-1 została dobrana w oparciu o wyliczoną medianę wartości tego wskaźnika dla całej grupy CKD5 =  $0,07 \mu\text{mol/mL}$ . Linia ciągła jest charakterystyczna dla chorych grupy CKD5, których wielkości wskaźnika były niższe od mediany. Z kolei linia przerywana ukazuje kumulowaną proporcję przeżycia dla chorych, których stężenia były wyższe lub równe medianie. Różnice pomiędzy grupami były istotne statystycznie (test log-rank)  $P = 0,006$ .

**Tabela 32.** Przeżycie w grupie chorych hemodializowanych w zależności od wielkości mediany PON-1

		Przeżycie [miesiące]							
		1	2	5	8	9	10	11	12
PON-1 [ $\mu\text{mol/mL}$ ]	$\geq 0,07$	93,3%					86,6%		
	$< 0,07$	91,6%	83,3%	66,6%	41,6%		33,3%		

**Tabela 33.** Przedstawienie wyników regresji proporcjonalnego hazardu Coxa dla PON-1

Regresja proporcjonalnego hazardu Coxa Chi2 = 7,62, P = 0,005									
zmienna	Beta	Błąd standardowy	Beta 95% dolna	Beta 95% górna	Wart t	Wald Statyst.	P	HR	95% CI
PON-1	1,9	0,79	0,36	3,486	2,41	5,83	0,01	6,85	1,43–32,66

95% CI – 95% przedział ufności, HR – współczynnik hazardu.

niższe charakteryzowali się 6,85 razy wyższym ryzykiem zgonu w porównaniu z chorymi dializowanymi, których stężenia PON-1 były wyższe lub równe medianie wyznaczonej dla całej grupy CKD5.

#### 6.1.4. Ocena ryzyka sercowo-naczyniowego

##### *N* – końcowy propeptyd natriuretyczny typu B (NT-proBNP)

W badanej populacji najwyższymi stężeniami NT-proBNP w surowicy krwi charakteryzowali się pacjenci z zaawansowaną chorobą nerek. Począwszy od CKD3-4 aż do grupy CKD5B chorzy mieli statystycznie istotne wyższe stężenia w porównaniu z osobami HV, CVD i CKD1-2 (Tabela 34). Na rycinie 44. i na podstawie analizy porównań wielokrotnych (Tabela 35) widać także wyraźnie, że różnice pomiędzy HV i CVD choć nie wykazywały znamienności statystycznej ( $P = 0,053$ ) były zauważalne. Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami CVD i CKD1-2.

Analiza zależności pomiędzy stężeniem NT-proBNP a wybranymi parametrami (Tabela 36) ujawniła istnienie dodatnich korelacji pomiędzy stężeniem NT-proBNP w surowicy krwi a czasem leczenia dializami, grubością blaszki miażdżycowej, stężeniem ferrytyny i iPTH. Z kolei odwrotne zależności odnotowano pomiędzy stężeniem NT-proBNP a stężeniem HGB, wielkością HCT, stężeniem triacylogliceroli, całkowitym cholesterolem i LDL cholesterolem, stężeniem białka całkowitego oraz wielkością eGFR. Nie zaobserwowano natomiast istotnych zależności pomiędzy wielkością NT-proBNP a nadciśnieniem tętniczym, adekwatnością dializ, leczeniem statynami, leczeniem ACEI, glikemią, stężeniem Fe, HDL-cholesterolu, albumin i wapnia całkowitego.

**Tabela 34.** Porównanie stężenia NT-proBNP w poszczególnych grupach badawczych

Zmienna	HV	CVD	Grupa pacjentów z PChN				P*	
			CKD			P*		
			CKD1-2	CKD3-4	CKD5			
					CKD5A			CKD5B
NT-proBNP [fmol/mL]	9,35 ± 3,94	44,92 ± 35,96	46,92 ± 38,23	131,34 ± 103,108	224,05 ± 102,81	0,00		
					221,46 ± 108,82	243,77 ± 93,78	0,00	

Wyniki przedstawione jako średnia ± SD. Dla porównań pomiędzy wszystkimi grupami stosowano test Kruskala-Wallisa. \*Wyróżniono wartość P, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ;

Za pomocą metody Kaplana-Meiera oszacowano prawdopodobieństwo przeżycia. Podzielono chorych z grupy CKD5 w zależności od stężenia NT-proBNP na dwie grupy, tj. jedna ze stężeniami mniejszymi od mediany (wyliczonej dla całej grupy CKD5 = 197,15 fmol/mL), druga to chorzy wykazujący stężenia wyższe lub równe medianie. Okazało się, że nie było istotnych różnic pomiędzy grupami odnośnie do prawdopodobieństwa przeżycia (test log rank  $P = 0,20$ ), co zostało przedstawione na rycinie 45.

**Tabela 35.** Przedstawienie wartości  $P$  dla porównań wielokrotnych (dwustronnych) dla zmiennej zależnej Nt-proBNP

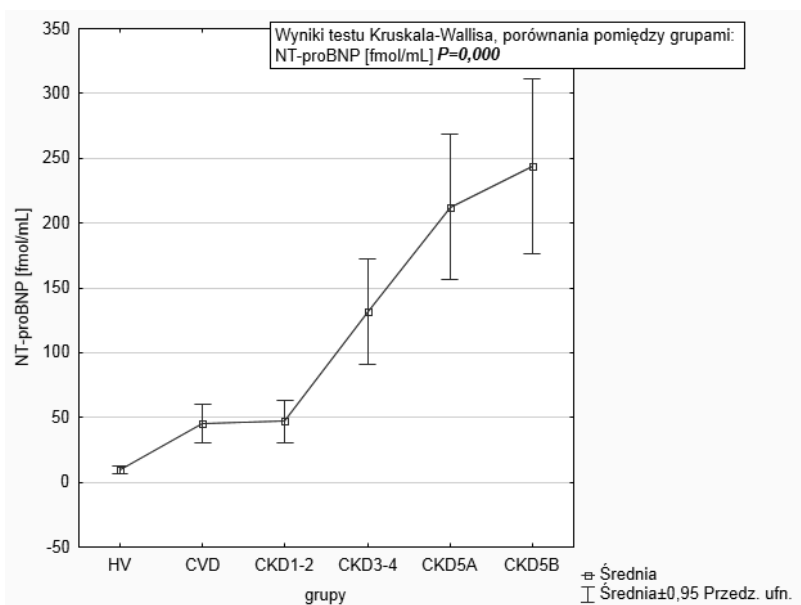
NT-proBNP [fmol/mL]	HV	CVD	CKD1-2	CKD3-4	CKD5A	CKD5B
HV		NS	<b>0,03</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
CVD	NS		NS	<b>0,017</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
CKD1-2	<b>0,03</b>	NS		<b>0,029</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
CKD3-4	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,029</b>		NS	NS
CKD5A	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	NS		NS
CKD5B	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	NS	NS	

Wyróżniono wartość  $P$ , gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; NS – oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie analizowanego parametru. Analizę przeprowadzono za pomocą testu Kruskala-Wallis.

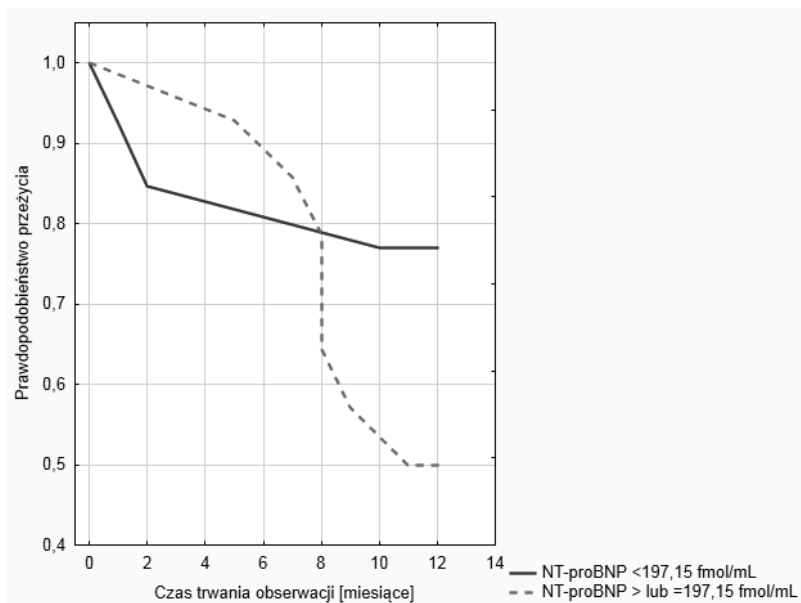
**Tabela 36.** Jednoczynnikowa analiza korelacji pomiędzy stężeniem NT-proBNP w surowicy krwi a wybranymi parametrami

Parametr	r	P
nadciśnienie tętnicze	0,06	NS
czas leczenia dializami [miesiące]	0,45	<b>0,00</b>
adekwatność dializy	0,07	NS
IMT [mm]	0,29	<b>0,00</b>
leczenie statynami	-0,09	NS
leczenie ACEI	-0,08	NS
glukoza [mg/dL]	-0,09	NS
HGB [g/dL]	-0,41	<b>0,00</b>
HCT [%]	-0,46	<b>0,00</b>
Fe [ $\mu$ mol/L]	-0,25	NS
ferrytyna [ng/mL]	0,46	<b>0,00</b>
triacylglicerole [mg/dL]	-0,24	<b>0,03</b>
całkowity cholesterol [mg/dL]	-0,30	<b>0,00</b>
HDL cholesterol [mg/dL]	-0,08	NS
LDL cholesterol [mg/dL]	-0,30	<b>0,00</b>
albuminy [g/dL]	-0,23	NS
białko całkowite [g/dL]	-0,34	<b>0,01</b>
wapń całkowity [mg/dL]	0,14	NS
iPTH [pg/mL]	0,52	<b>0,00</b>
eGFR [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	-0,64	<b>0,00</b>

Wyróżniono wartość  $P$ , gdy korelacje pomiędzy stężeniem NT-proBNP a wybranym parametrem były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; r – współczynnik korelacji Pearsona, NS – oznacza brak istotności statystycznej.



Rycina 44. Zmiany stężeń Nt-proBNP w badanych grupach.



Rycina 45. Wykres funkcji przeżycia chorych hemodializowanych w zależności od wielkości stężenia NT-proBNP. Wielkość grupująca dla NT-proBNP została dobrana w oparciu o wyliczoną medianę stężeń NT-proBNP dla całej grupy CKD5 = 197,15 fmol/mL. Linia ciągła jest charakterystyczna dla chorych grupy CKD5, których stężenia były niższe od mediany. Z kolei linia przerywana ukazuje kumulowaną proporcję przeżycia dla chorych, których stężenia były wyższe lub równe medianie. Różnice pomiędzy grupami były nieistotne statystycznie (test log-rank)  $P = 0,20$ .



## 6.2. Badania proteomiczne

### 6.2.1. Wstępne wyniki

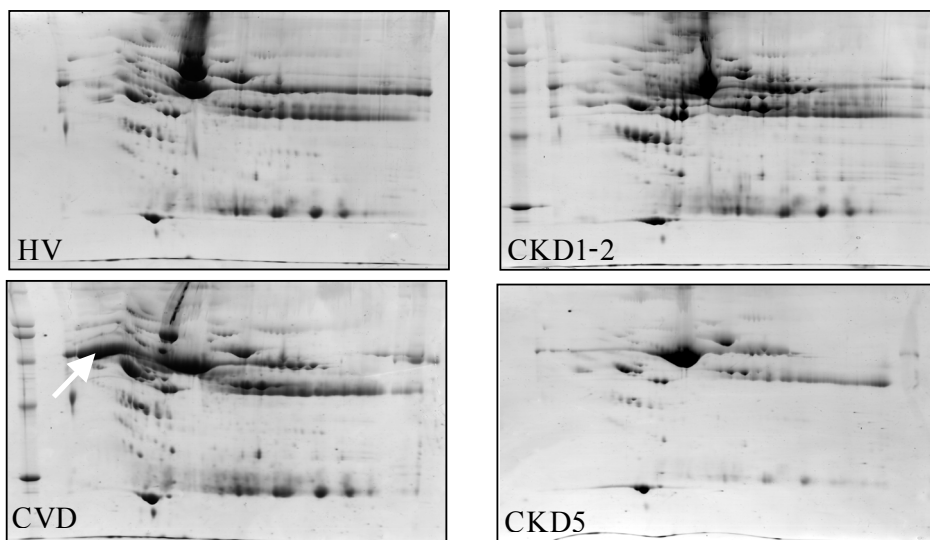
*Wstępne wyniki przeprowadzone na osoczu 4 osób – najbardziej charakterystycznych przedstawicieli grup HV, CVD, CKD1-2 i CKD5*

*Badania wykonane zostały przez dr M. Łuczak w ramach przygotowania grantu nr NN 402 2098 33*

Wstępne wyniki uzyskane na podstawie analiz proteomu w grupie 4 osób, które zakwalifikowano do czterech grup, tj. HV, CVD, CKD1-2 i CKD5. Ogólna charakterystyka tych osób z uwzględnieniem wywiadu i podstawowych parametrów laboratoryjnych została przedstawiona w tabeli 3.

W ramach tych badań dokonano wstępnych porównań profili białkowych osocza osób będących przedstawicielami czterech grup badawczych. Profile białkowe czterech osób zostały przedstawione na rycinie 46.

Na podstawie wykonanych wstępnych analiz proteomów zauważono istotne różnice pomiędzy badanymi profilami białek. Stało się to główną motywacją do podjęcia dalszych badań.



**Rycina 46.** Porównanie profili białkowych osocza zdrowego ochotnika (HV), chorego z zaawansowaną postacią miażdżycy (CVD), chorego w stadium I przewlekłej choroby nerek (eGFR 81,7 ml/min/1,73m<sup>2</sup>) (CKD1-2) i chorego w okresie schyłkowej niewydolności nerek leczonego od 5 lat przewlekłą powtarzaną hemodializą (CKD5), strzałka pokazuje dodatkową izoformę albuminy u chorego (CVD).

Szczególnie istotne różnice zanotowano w przypadku osocza pacjenta dializowanego (CKD5), u którego akumulacja białek była niska.

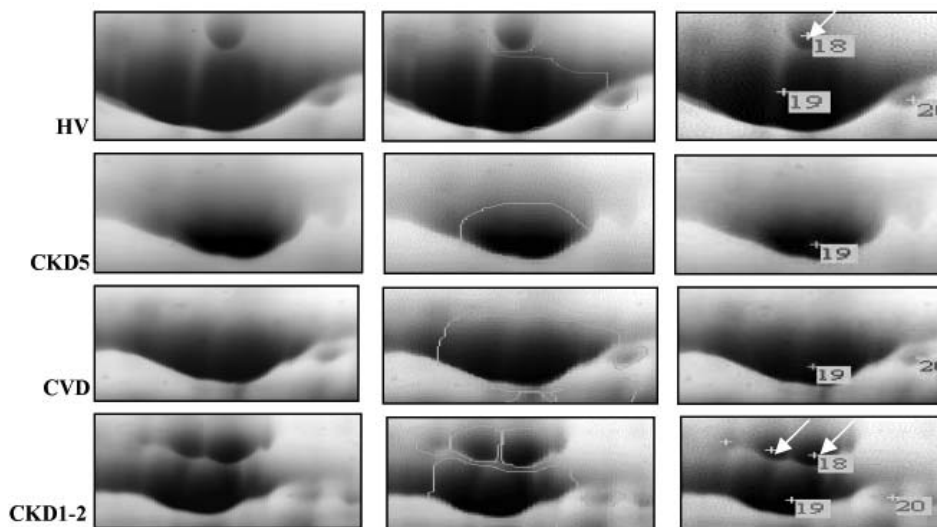
Ponadto, zidentyfikowano kilka białek, wśród których były albumina, transferyna, fibrynogen  $\beta$  i  $\gamma$  oraz  $\alpha$ -1mikroglobulina, których profile różniły się pod względem ilościowym pomiędzy badanymi osoczami. Niektóre z nich wykazywały również istotne różnice jakościowe.

### *Akumulacja transferyny*

Akumulacja transferyny (masa cząsteczkowa 79, 280 kDa, punkt izoelektryczny 6,81) w osoczu zdrowym (HV) była zdecydowanie większa w porównaniu z akumulacją stwierdzoną we wszystkich pozostałych grupach. Jeśli chodzi o zmiany jakościowe, to w osoczu chorego CKD1-2 oprócz głównej plamki transferyny obserwowano dwie jej dodatkowe izoformy (oznaczone na rycinie 47. strzałkami). Białka te charakteryzował podobny punkt izoelektryczny, jednak różniły się masą cząsteczkową o kilka kDa w porównaniu z główną formą transferyny (to prawdopodobnie izoformy tego białka o innych lub dodatkowych łańcuchach oligosacharydowych). Porównanie powierzchni i intensywności analizowanych plamek transferyny zostało przedstawione w tabeli 37.

### *Akumulacja $\beta$ -fibrynogenu*

Akumulacja  $\beta$ -fibrynogenu (masa cząsteczkowa 56,5 kDa, punkt izoelektryczny 6,81) była podobna w przypadku HV, CKD1-2, CVD. W osoczu białko to wy-

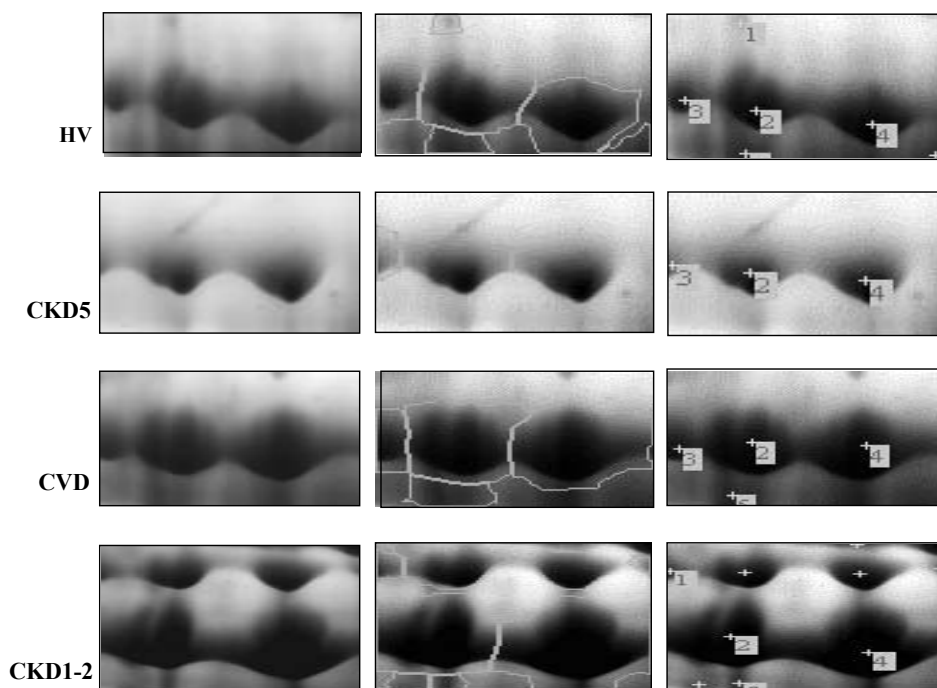


**Rycina 47.** Porównanie profilów białkowych transferyny. Główna izoforma tego białka została oznaczona numerem 19. Strzałkami oznaczono dodatkowe izoformy transferyny. Analiza plamek białka i jego izoform została wykonana przy użyciu programu Image Master Platinum (GE Healthcare).

**Tabela 37.** Porównanie powierzchni i intensywności analizowanych plamek transferyny. Zastosowano program Image Master Platinum (GE Healthcare)

Powierzchnia plamy transferyny [%vol]				
nr plamy	HV	CKD5	CKD1-2	CVD
18	1,372	0	2,628	0
19	1,202	0,962	1,001	0,969
20	1,135	0	1,208	1,259
Intensywność plamy białka				
18	1,371	0	2,628	0
19	1,202	0,962	0,739	1,095
20	1,125	0	1,531	1,333

stępuje w postaci dwóch izoform, które mają taką samą masę cząsteczkową, lecz różnią się punktem izoelektrycznym. W osoczu pacjenta CKD1-2 stwierdzono obecność 4 izoform tego białka. Różnica ich mas cząsteczkowych wynosiła około 8 kDa, co może sugerować zmiany na poziomie glikozylacji białek. Profile białkowe  $\beta$ -fibrynogenu zostały pokazane na rycinie 48. Z kolei zestawienie wyników analizy powierzchni i intensywności analizowanych plam, z podziałem na grupy badanych, zostało zebrane w tabeli 38.



**Rycina 48.** Porównanie profili białkowych  $\beta$ -fibrynogenu. Główne izoformy tego białka zostały oznaczone numerami 2 i 4. Analiza plamek białka i jego izoform została wykonana przy użyciu programu Image Master Platinum (GE Healthcare).

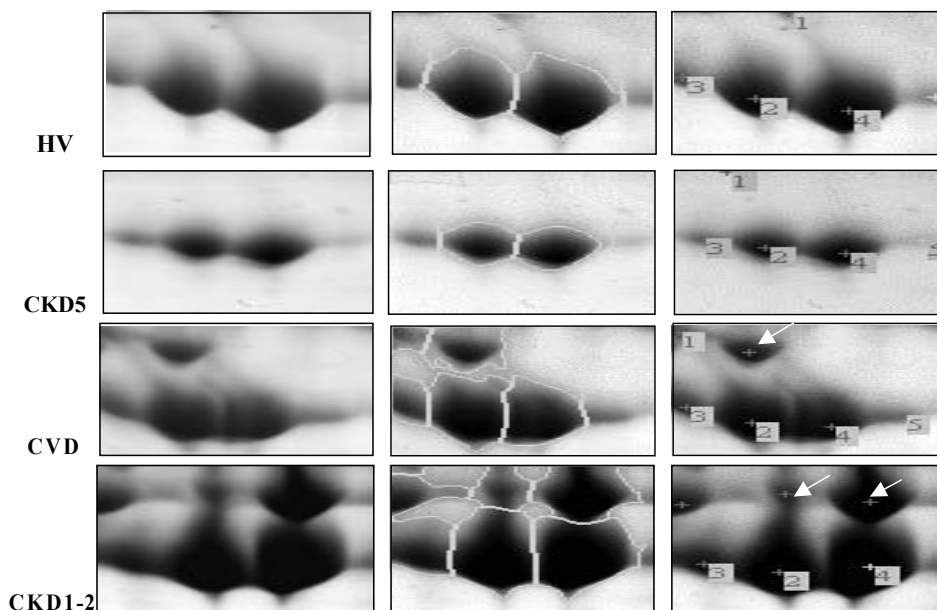
**Tabela 38.** Porównanie powierzchni i intensywności analizowanych plamek  $\beta$ -fibrynogeny

nr plamy	Powierzchnia plamy $\beta$ -fibrynogeny [%vol]			
	HV	CKD5	CKD1-2	CVD
2	0,996	0,992	1,009	1,002
4	0,857	1,07	1,014	1,055
Intensywność plamy białka				
2	0,946	0,533	1,304	1,215
4	0,799	0,443	1,508	1,248

### Akumulacja $\gamma$ -fibrynogeny

W przypadku  $\gamma$ -fibrynogeny (masa cząsteczki 50 kDa, punkt izoelektryczny 5,7) także zaobserwowano większą liczbę izoform u badanych chorych w porównaniu z osoczem zdrowego ochotnika. W profilu osocza osoby zdrowej obserwowano 2 izoformy  $\gamma$ -fibrynogeny, w profilu chorego CKD1-2 wykryto 4 izoformy tego białka, a u chorego CVD trzy izoformy. Zostało to przedstawione na rycinie 49. Natomiast zestawienie wyników analizy powierzchni i intensywności analizowanych plam, z podziałem na grupy badanych, zostało zebrane w tabeli 39.

Dodatkowo, u chorego CVD wykryto obecność dwóch dodatkowych zmian w proteomie w porównaniu do wyników uzyskanych w przypadku pozostałych badanych: dodatkową izoformę albuminy ulegającą akumulacji w bardzo wyso-

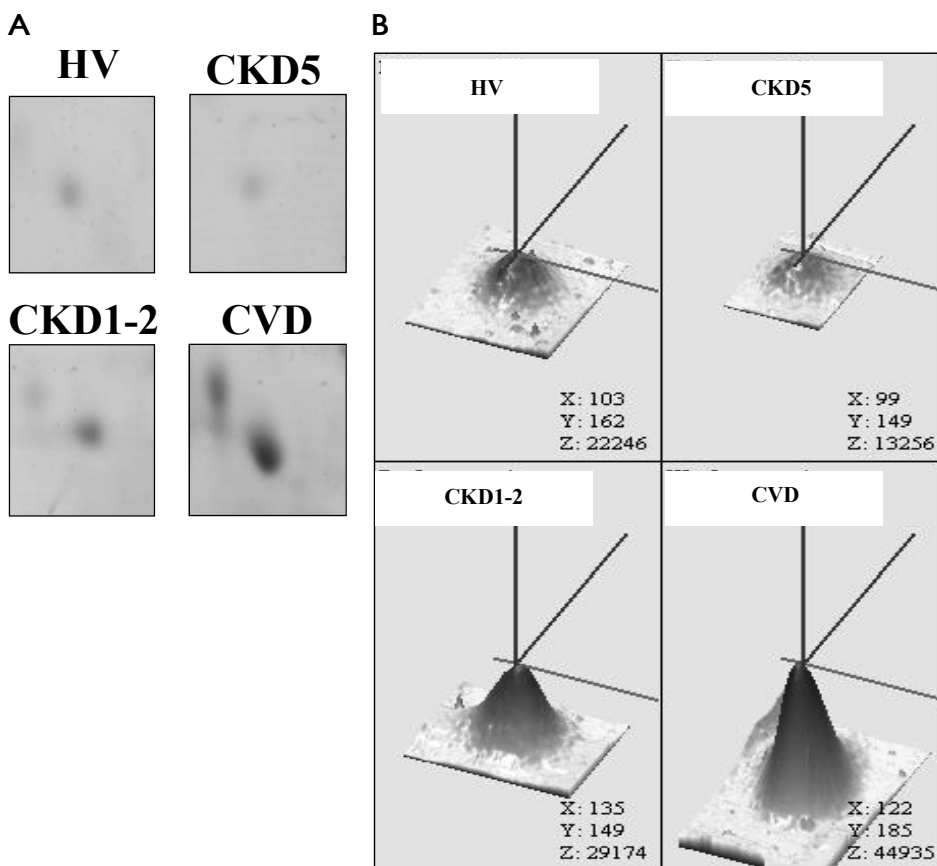


**Rycina 49.** Porównanie profilów białkowych  $\gamma$ -fibrynogeny. Główne izoformy tego białka zostały oznaczone numerami 2 i 4. Strzałkami oznaczono dodatkowe izoformy  $\gamma$ -fibrynogeny. Analiza plamek białka i jego izoform została wykonana przy użyciu programu Image Master Platinum (GE Healthcare).

**Tabela 39.** Porównanie powierzchni i intensywności analizowanych plamek  $\gamma$ -fibrynogenu

Powierzchnia plamy $\gamma$ -fibrynogenu [%vol]				
nr plamy	HV	CKD5	CKD1-2	CVD
2	0,908	1,043	1,074	1,159
4	1,074	1,077	1,05	0,962
Intensywność plamy białka				
2	0,937	1,043	1,073	0,946
4	0,951	1,069	1,005	0,928

kim stopniu (Rycina 46) oraz zwiększoną akumulację mikroglobuliny (Rycina 50), należącej do rodziny lipokalin i wykazującej zdolność wiązania i transportowania ligandów hydrofobowych, np. kwasów tłuszczowych. Białku temu przypisuje się również rolę ochronną jako wychwytywacza małych toksycznych substancji.



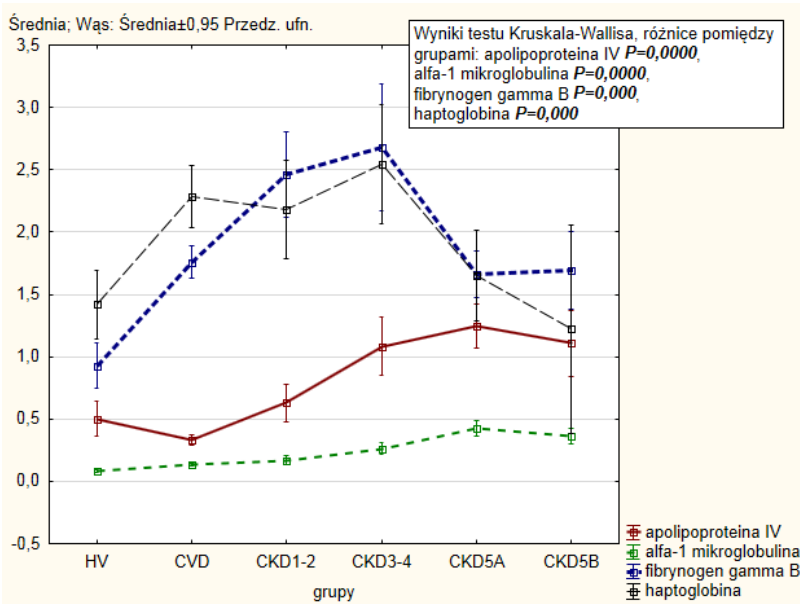
**Rycina 50.** Profile białkowe mikroglobuliny. a) Porównanie profili białkowych mikroglobuliny należącej do rodziny lipokalin u czterech badanych osób. b) Wizualizacja trójwymiarowa plamek białkowych (spots) z żelu. Analiza plamek białka i jego izoform została wykonana przy użyciu programu Image Master Platinum (GE Healthcare).

## 6.2.2. Wyniki głównych badań proteomicznych przeprowadzonych w ramach grantu. Wyniki częściowo opublikowane [188]

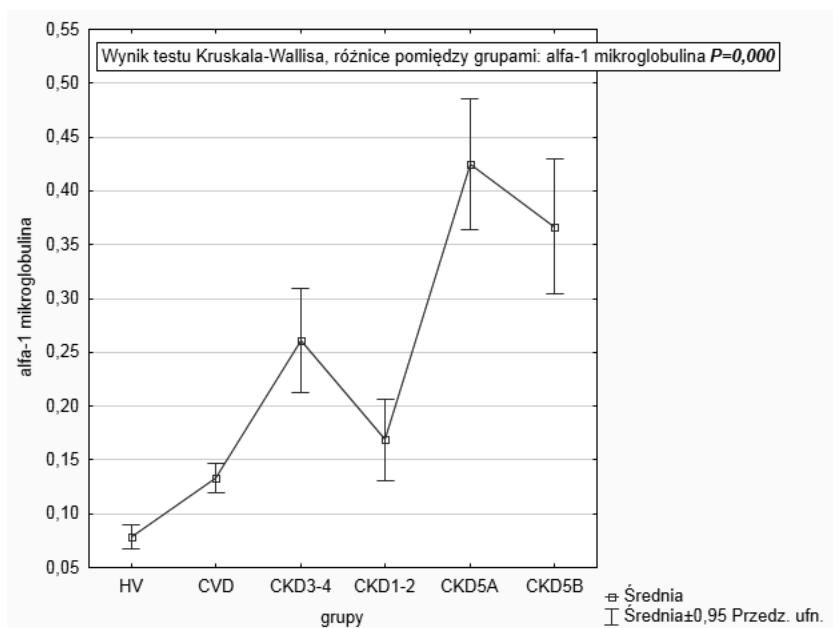
Analiza porównawcza proteomów wszystkich badanych grup wykazała, istotne różnice (w obrębie grup HV i CKD oraz grup HV i CVD). Różnice te dotyczyły czterech białek, tj.  $\alpha$ -1-mikroglobuliny, apolipoproteiny A-IV (apo A-IV), fibrynogeny oraz haptoglobiny. Na rycinie 51. przedstawiono: rozkład względnych akumulacji czterech białek, którymi różniły się proteomy pacjentów w porównaniu z proteomami osób zdrowych (traktowanych jak kontrole).

Zaobserwowano relatywny wzrost akumulacji  $\alpha$ -1-mikroglobuliny w osoczu pacjentów z grup CKD w porównaniu do HV oraz korelację tych zmian z postępowaniem niewydolności nerek. Rozkład względnej akumulacji  $\alpha$ -1-mikroglobuliny w badanych grupach przedstawiono na rycinie 52. Z kolei na rycinie 53. uwidoczono odwrotną zależność pomiędzy względną akumulacją  $\alpha$ -1-mikroglobuliny i wielkością eGFR ( $r = -0,8, P = 0,000$ ).

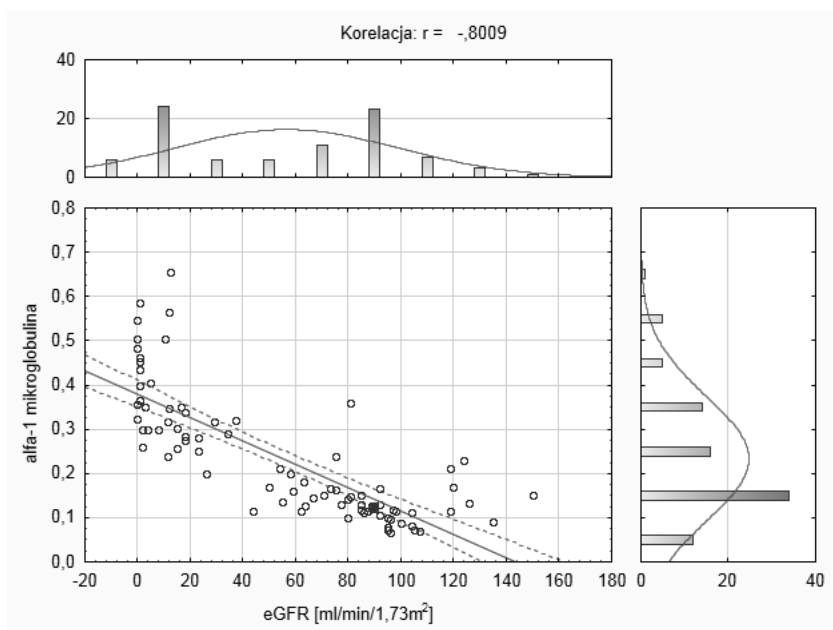
Zauważono również istotny spadek akumulacji apolipoproteiny A-IV (apo A-IV) w osoczu pacjentów z CVD w porównaniu do HV, a z drugiej strony bardzo gwałtowny wzrost akumulacji tego białka u pacjentów z CKD w porównaniu do HV. Zmiany względnej akumulacji apo A-IV w osoczu badanych grup zostały zaprezentowane na rycinie 54. Intensywność zmian również skorelowana była ze stopniem postępu PChN. Odwrotna statystycznie istotna zależność pomiędzy apolipoproteiną A-IV a wielkością eGFR została pokazana na rycinie 55.



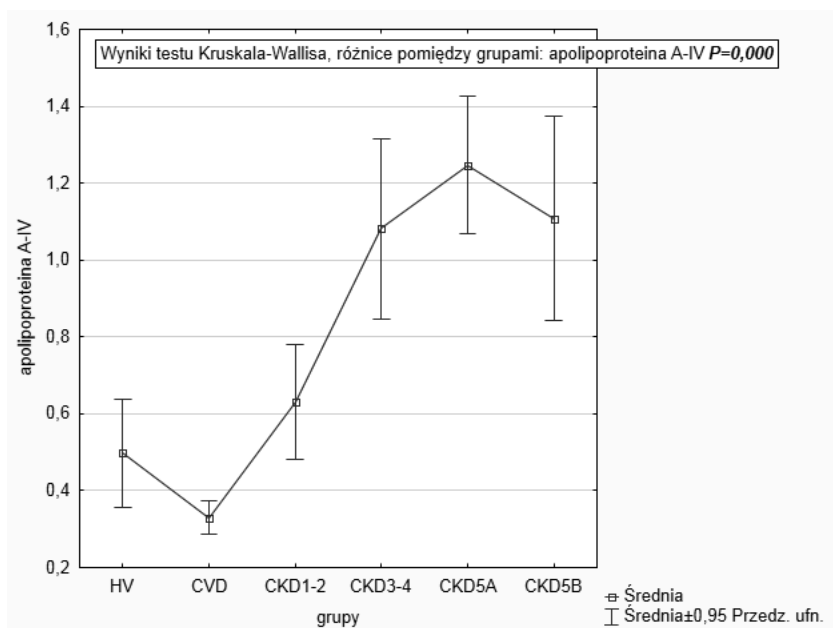
Rycina 51. Rozkład względnych akumulacji czterech białek w osoczu, którymi różniły się badane proteomy. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  95% CI.



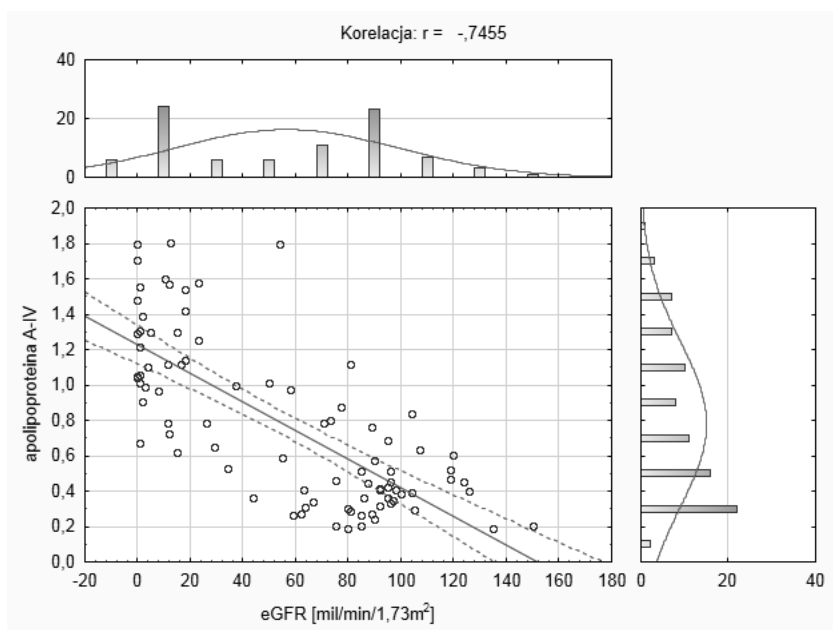
Rycina 52. Zmiany względnej akumulacji alfa-1-mikroglobuliny w osoczu badanych grup.



Rycina 53. Wykres rozrzutu wraz z histogramami i zaznaczonymi przerywanymi liniami 95% przedziałem ufności, przedstawiający ujemną korelację pomiędzy względną akumulacją  $\alpha$ -1-mikroglobuliny w osoczu a wielkością eGFR [mL/min/1,73m<sup>2</sup>].



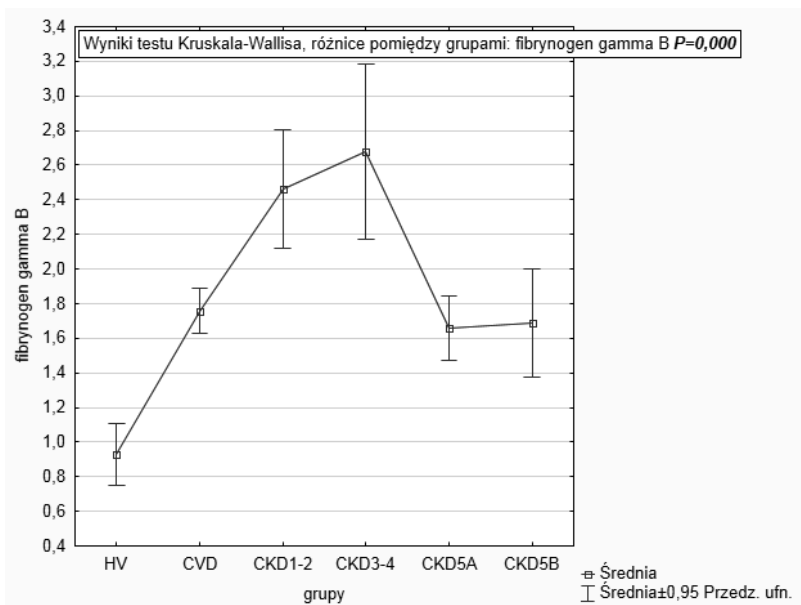
Rycina 54. Zmiany względnej akumulacji apolipoproteiny A-IV w osoczu badanych grup.



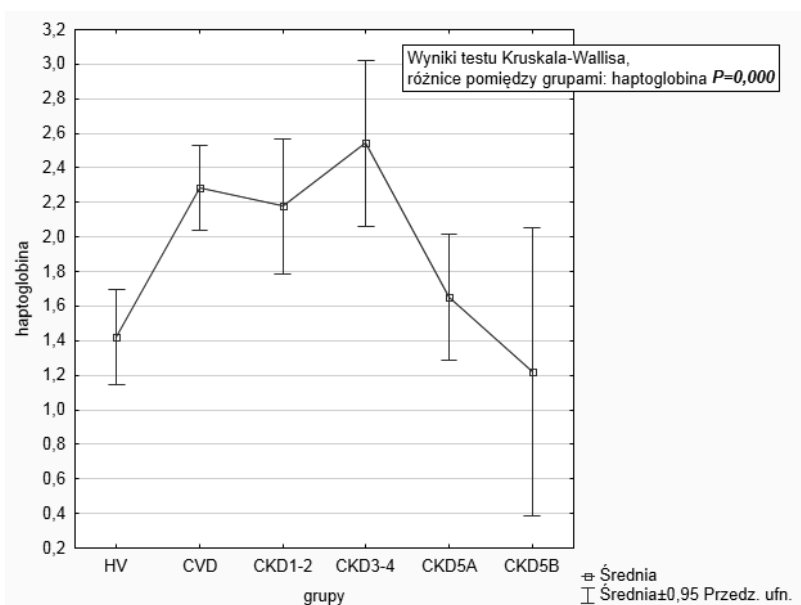
Rycina 55. Wykres rozrzutu wraz z histogramami i zaznaczonym przerywanymi liniami 95% przedziałem ufności, przedstawiający ujemną korelację pomiędzy akumulacją apolipoproteiny A-IV w osoczu a wielkością eGFR [mL/min/1,73m<sup>2</sup>].



Kolejnym różnicującym białkiem była haptoglobina i fibrynogen, których poziom wzrastał w osoczu wszystkich badanych grup pacjentów w porównaniu do kontroli. Wyniki tych analiz zostały zaprezentowane na rycinie 56. i 57.



Rycina 56. Zmiany względnej akumulacji fibrynogenu gamma B w osoczu badanych grup.



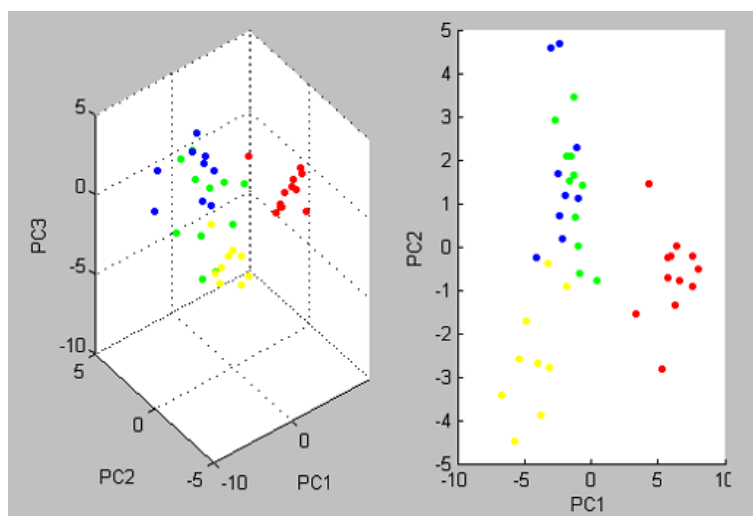
Rycina 57. Zmiany względnej akumulacji haptoglobiny w badanych grupach.

### Analiza zmian modyfikacji postranslacyjnych

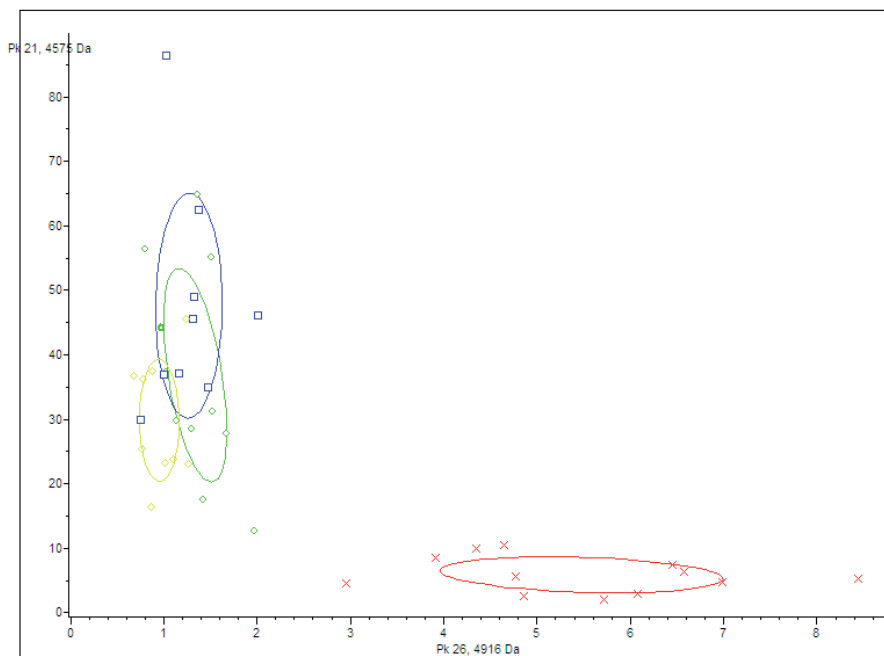
Analiza zmian na poziomie modyfikacji potranslacyjnych wskazała na obecność dwóch odmiennych fosforylowanych białek w grupach CKD5 oraz CVD, w porównaniu do zmian obserwowanych w pozostałych grupach. Wyniki te zostały potwierdzone za pomocą spektrometrii mas i analiz *in silico* z wykorzystaniem programu Mascot™. Badania wykazały, że białko wiążące witaminę D w osoczu HV oraz grup CKD1-2 i CKD3-4 posiadało z reguły dwa lub trzy peptydy potencjalnie fosforylowane, natomiast białko to u pacjentów CKD5 oraz pacjentów CVD posiadało zawsze od 13 do 16 peptydów potencjalnie fosforylowanych. Uzyskane wyniki wskazują, iż zmiany w poziomie fosforylacji mogą być związane z zaawansowaniem choroby sercowo-naczyniowej.

Ponadto wykonano analizę białek niskocząsteczkowych z użyciem filtrów o dwóch punktach odcięcia, tj. 30 i 50 kDa. Wyizolowana populacja białek niskocząsteczkowych analizowana była z wykorzystaniem spektrometrii mas MALDI z ominięciem etapu elektroforezy. Wyniki wielowymiarowej analizy głównych składowych tej frakcji białek (PCA) wykazały wysokie podobieństwo pomiędzy profilami pacjentów CKD1-2 oraz CVD, co zostało pokazane na rycinie 58.

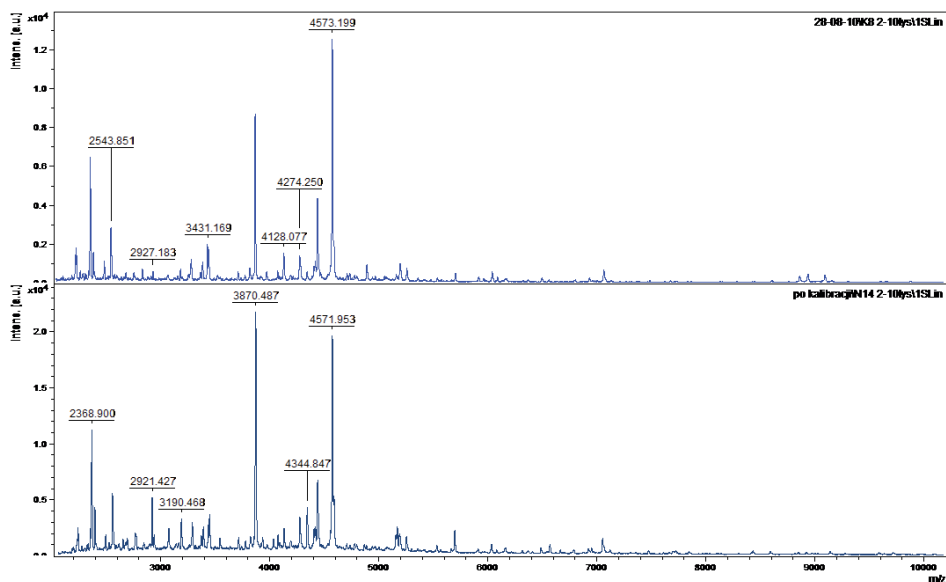
Znaleziono osiem białek niskocząsteczkowych o następujących masach: 2472,03; 4916,48; 2342,52; 4574,53; 4872,9; 4966,38; 4417,55 oraz 6246,43 Da., które różnicowały wszystkie grupy pacjentów. W niektórych przypadkach poziom akumulacji tych białek wzrastał u badanych pacjentów w porównaniu do HV, w innych obniżał się. Jednak u wszystkich profil tych 8 białek wykazywał bardzo duże podobieństwo pomiędzy grupą CKD1-2 oraz CVD i istotnie różnił się w grupie CKD5 w porównaniu z pozostałymi grupami. Zostało to przedstawione na rycinach 59. i 60.



**Rycina 58.** Wyniki wielowymiarowej analizy PCA uzyskanej z użyciem programu ClinPro Tools 2.2. Kolor czerwony – CKD-5, żółty – HV, niebieski – CVD, zielony – CKD1-2.



**Rycina 59.** Korelacja intensywności sygnałów dla dwóch wybranych peptydów różnicujących 4916,48 Da oraz 4574,53 Da. Kolor czerwony – CKD-5, żółty – HV, niebieski – CVD, zielony – CKD1-2.

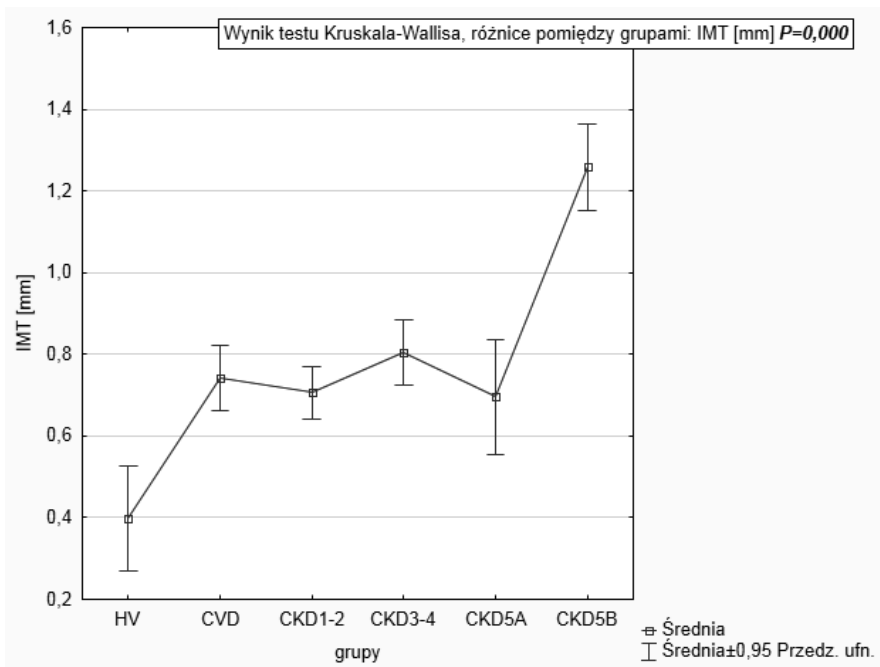


**Rycina 60.** Porównanie widm masowych białek i peptydów uzyskanych techniką MALDI w zakresie mas 2000–10000Da. Widma ukazują wysoki stopień podobieństwa pomiędzy profilami białek niskocząsteczkowych osocza pacjentów CVD (górne widmo) i CKD1-2 (dolne widmo).

### 6.3. Ocena grubości blaszki miażdżycowej

#### Grubość kompleksu błona wewnętrzna–błona środkowa tętnicy szyjnej (intima-media thickness, IMT)

Najwyższe wartości IMT (Rycina 61) w badanych grupach wykazywali pacjenci hemodializowani, którzy zmarli w czasie 12-miesięcznej obserwacji. Z kolei pozostali chorzy mieli podobne IMT i różnili się jedynie w porównaniu z HV i CKD5B (Tabela 40).



Rycina 61. Zmiany IMT w badanych grupach.

W celu oceny zmienności IMT wykonano analizę regresji wieloczynnikowej metodą krokową postępującą, uzyskując model, który tłumaczył zmienność IMT w 99,7% ( $R^2 = 99,7\%$ , błąd standardowy estymacji = 0,04,  $P < 0,001$ ). W „najlepszym” modelu znalazły się następujące parametry: PON-1, neopteryna, HDL-cholesterol, eGFR,  $PO_4$ , iPTH, NT-proBNP, hsCRP, BMI, leczenie HD, stężenie ADMA, MPO. Istotny wpływ ( $P < 0,05$ ) wywierały PON-1, eGFR,  $PO_4$ , iPTH, NT-proBNP, hsCRP, BMI, ADMA i MPO. Wyniki analizy zostały przedstawione w tabeli 41.

**Tabela 40.** Przedstawienie wartości *P* dla porównań wielokrotnych (dwustronnych) dla zmiennej zależnej IMT [mm]

IMT [mm]	HV	CVD	CKD1-2	CKD3-4	CKD5A	CKD5B
HV		<b>0,002</b>	<b>0,01</b>	<b>0,000</b>	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>
CVD	<b>0,002</b>		NS	NS	NS	<b>0,000</b>
CKD1-2	<b>0,01</b>	NS		NS	NS	<b>0,000</b>
CKD3-4	<b>0,000</b>	NS	NS		NS	<b>0,000</b>
CKD5A	<b>0,003</b>	NS	NS	NS		<b>0,000</b>
CKD5B	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	

Wyróżniono wartość *P*, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ ; NS – oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie analizowanego parametru. Analizę przeprowadzono za pomocą testu Kruskala-Wallis.

**Tabela 41.** Podsumowanie wyników regresji wielorakiej dla zmiennej zależnej IMT ( $F = 101,84$ , Błąd std. estymacji: 0,041,  $P < 0,001$ )

	współczynnik beta	P	R = 99,86	R <sup>2</sup> =99,7
PON1 [ug/mL]	-0,75	<b>0,001</b>		
neopteryna [nmol/L]	0,00	0,937		
HDL cholesterol [mg/dL]	-0,06	0,151		
eGFR	0,377	<b>0,006</b>		
PO4 [mg/dL]	0,722	<b>0,000</b>		
iPTH [pg/mL]	0,722	<b>0,000</b>		
NT-proBNP [fmol/mL]	-0,333	<b>0,004</b>		
hsCRP [mg/l]	0,422	<b>0,002</b>		
BMI kg/m <sup>2</sup>	0,210	<b>0,013</b>		
leczenie HD [miesiące]	-0,040	0,66		
ADMA [umol/L]	0,270	<b>0,03</b>		
MPO [ug/L]	0,161	<b>0,03</b>		
ferrytyna	0,187	<b>0,10</b>		

Wyróżniono wartość *P*, gdy korelacje pomiędzy IMT a wybranym parametrem były statystycznie istotne, przy założonym poziomie istotności statystycznej  $P < 0,05$ .

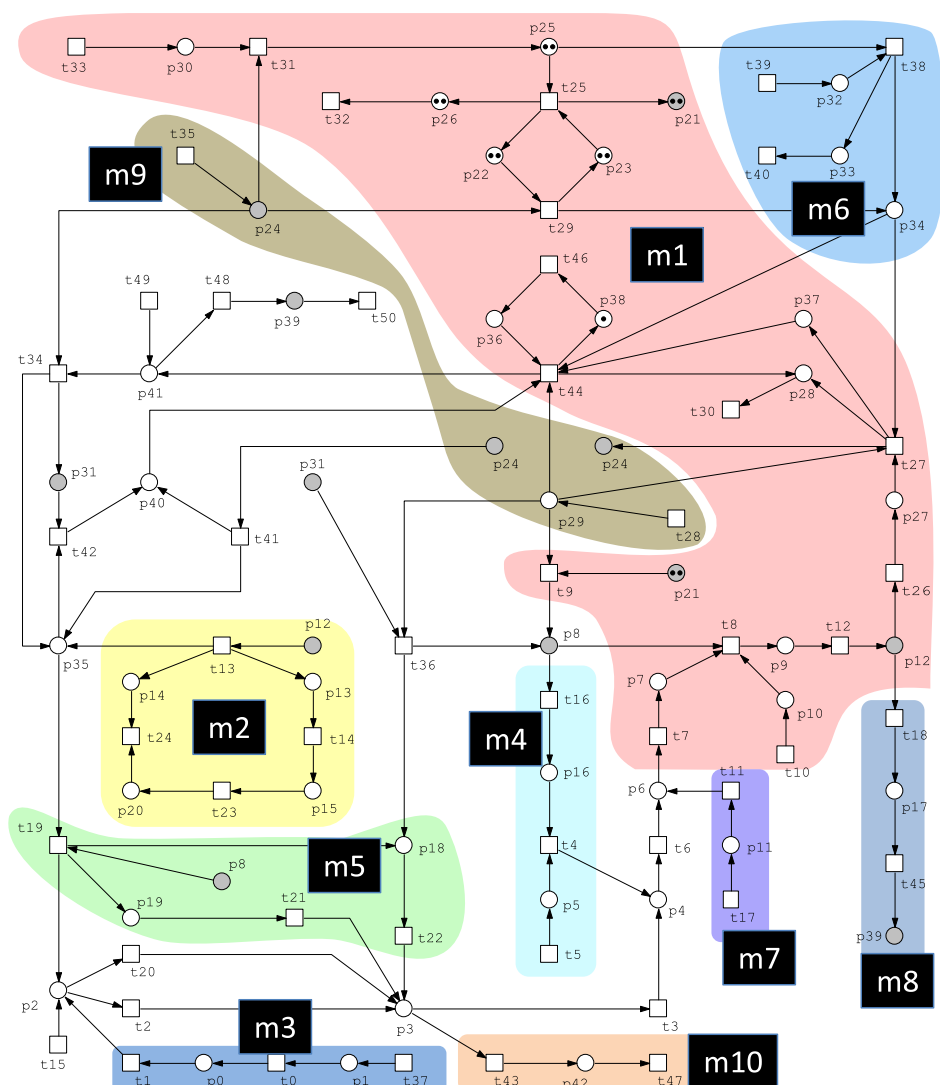
## 6.4. Badania systemowe

### 6.4.1. Udział stresu oksydacyjnego w powstawaniu i rozwoju miażdżycy

#### 6.4.1.1. Model udziału stresu oksydacyjnego w powstawaniu i rozwoju miażdżycy oparty na sieciach Petriego

W tym podrozdziale zostanie przedstawiony formalny szczegółowy model udziału stresu oksydacyjnego w powstawaniu i rozwoju miażdżycy (Rycina 62) oparty

na sieciach Petriego. Model stanowi prezentację wspomnianego procesu, opisanego w sposób nieformalny w podrozdziale 2.2.3. Zawiera on 43 miejsca ( $P = \{p_0, p_1, \dots, p_{42}\}$ ) i 51 tranzycji ( $T = \{t_0, t_2, \dots, t_{50}\}$ ). Numery miejsc i tranzycji wraz z przyporządkowanymi im nazwami/charakterystykami zostały przedstawione odpowiednio w tabelach 42. i 43.



**Rycina 62.** Model udziału stresu oksydacyjnego w przebiegu miażdżycy przedstawiony za pomocą sieci Petriego, z zaznaczeniem na kolorowo poszczególnych zbiorów MCT.

**Tabela 42.** Charakterystyka miejsc modelu udziału stresu oksydacyjnego w powstawaniu i rozwoju miażdżycy przedstawionego za pomocą sieci Petriego na rycinie 62

Miejsce	Nazwa miejsca	Miejsce	Nazwa miejsca
$p_0$	śródbłonek w stanie zapalnym	$p_{22}$	jony żelazowe ( $Fe^{3+}$ )
$p_1$	proces zapalny	$p_{23}$	jony żelazowe ( $Fe^{2+}$ )
$p_2$	VCAM-1	$p_{24}$	anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^-$ )
$p_3$	leukocyty wczesnie napływające do zmienionego śródbłonka	$p_{25}$	nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ )
$p_4$	monocyty w błonie środkowej	$p_{26}$	anion hydroksylowy (OH <sup>-</sup> )
$p_5$	CCR2	$p_{27}$	oksydaza NADPH
$p_6$	makrofagi w błonie środkowej	$p_{28}$	NADP <sup>+</sup>
$p_7$	makrofagi z receptorami typu scavenger (SRA, CD36)	$p_{29}$	NADPH
$p_8$	cząsteczki lipoprotein modyfikowane przez oksydację	$p_{30}$	dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)
$p_9$	kompleksy zmodyfikowanych lipoprotein połączonych z receptorami typu scavenger na powierzchni makrofagów	$p_{31}$	nadtlenoazotyn (OONO)
$p_{10}$	cząsteczki lipoprotein modyfikowane przez glikację	$p_{32}$	katalaza
$p_{11}$	M-CSF	$p_{33}$	woda
$p_{12}$	komórki piankowe	$p_{34}$	tlen
$p_{13}$	MMP	$p_{35}$	cytokiny
$p_{14}$	czynnik tkankowy	$p_{36}$	L-arginina
$p_{15}$	zmniejszenie czapki włóknistej blaszki miażdżycowej	$p_{37}$	kation wodorowy
$p_{16}$	MCP-1	$p_{38}$	L-cytrulina
$p_{17}$	ciała apoptotyczne	$p_{39}$	zaawansowana blaszka miażdżycowa, której rozwój jest stymulowany przez NO
$p_{18}$	ICAM-1	$p_{40}$	iNOS
$p_{19}$	selektyna E	$p_{41}$	NO
$p_{20}$	pęknięcie blaszki miażdżycowej	$p_{42}$	wczesna blaszka miażdżycowa
$p_{21}$	wysoce toksyczny rodnik hydroksylowy (OH <sup>•</sup> )		

**Tabela 43.** Charakterystyka tranżycji modelu udziału stresu oksydacyjnego w powstawaniu i rozwoju miażdżycy przedstawionego za pomocą sieci Petriego na rycinie 62

Tranżycja	Nazwa tranżycji	Tranżycja	Nazwa tranżycji
$t_0$	aktywacja komórek śródbłonka przez proces zapalny	$t_{26}$	aktywacja oksydazy NADPH
$t_1$	zwiększona ekspresja cząsteczek adhezyjnych leukocytów	$t_{27}$	proces katalizowany przez oksydazę NADPH
$t_2$	wczesna rekrutacja leukocytów i ich napływ do tworzących się zmian miażdżycowych, proces przylegania monocytów do śródbłonka – łączenie VCAM-1 i VLA4	$t_{28}$	reakcje szlaku pentozofosforanowego, w następstwie których powstaje NADPH

cd. tabeli 43.

Tranzycja	Nazwa tranzycji	Tranzycja	Nazwa tranzycji
t <sub>3</sub>	penetracja monocytów do błony środkowej naczyń	t <sub>29</sub>	reakcja redukcji żelaza
t <sub>4</sub>	łączenie MCP-1 z CCR2	t <sub>30</sub>	dostarczenie atomów wodoru i elektronów potrzebnych do syntezy nowych związków przez NADP+
t <sub>5</sub>	ekspresja CCR2	t <sub>31</sub>	reakcja katalizowana przez SOD
t <sub>6</sub>	monocyty nabywają własności makrofagów tkankowych	t <sub>32</sub>	wykorzystanie jonu wodorowego
t <sub>7</sub>	ekspresja receptorów zmiatających	t <sub>33</sub>	uruchomienie mechanizmów obronnych organizmu aktywujących dysmutazę ponadtlenkową
t <sub>8</sub>	łączenie zmodyfikowanych lipoprotein i receptorów zmiatających znajdujących się na powierzchni komórek jednojądrzastych	t <sub>34</sub>	reakcja powstawania nadtlenoazotynu zachodząca przy udziale NO i anionorodnika ponadtlenkowego
t <sub>9</sub>	peroksydacja lipidów poprzez rodnik hydroksylowy	t <sub>35</sub>	zwiększona synteza anionorodnika ponadtlenkowego pod wpływem zmiany równowagi redoks w komórkach będącej następstwem działania wielu czynników patofizjologicznych
t <sub>10</sub>	proces glikacji	t <sub>36</sub>	peroksydacja lipidów pod wpływem nadtlenoazotynu
t <sub>11</sub>	stymulacja powstawania kolonii makrofagów	t <sub>37</sub>	proces zapalny
t <sub>12</sub>	przekształcenie makrofagów obciążonych CE w komórki piankowe	t <sub>38</sub>	reakcja katalizowana przez katalazę
t <sub>13</sub>	wydzielanie przez komórki piankowe czynnika zewnętrznego, MMPs oraz stymulacja uwalniania cytokin	t <sub>39</sub>	uruchomienie mechanizmów obronnych organizmu aktywujących katalazę
t <sub>14</sub>	degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej	t <sub>40</sub>	zużycie wody
t <sub>15</sub>	wpływ diety bogatej w cholesterol	t <sub>41</sub>	aktywacja iNOS pod wpływem cytokin uwalnianych w wyniku degranulacji mastocytów pod wpływem anionorodnika ponadtlenkowego
t <sub>16</sub>	ekspresja MCP-1	t <sub>42</sub>	aktywacja iNOS pod wpływem cytokin uwalnianych przez komórki piankowe
t <sub>17</sub>	synteza M-CSF przez komórki śródbłonna i komórki mięśni gładkich naczyń	t <sub>43</sub>	narastanie blaszki miażdżycowej poprzez infiltrację leukocytów
t <sub>18</sub>	przekształcenie komórek piankowatych w ciała apoptotyczne	t <sub>44</sub>	reakcja katalizowana przez iNOS
t <sub>19</sub>	pobudzenie śródbłonna do syntezy cząsteczek adhezyjnych	t <sub>45</sub>	uszkodzenie śródbłonna
t <sub>20</sub>	transdukcja sygnałów pomiędzy leukocytami i komórkami śródbłonna pod wpływem VCAM-1	t <sub>46</sub>	synteza L-argininy



cd. tabeli 43.

Tranzycja	Nazwa tranzycji	Tranzycja	Nazwa tranzycji
$t_{21}$	proces przylegania monocytów do śródbłonna za pośrednictwem selektyny E	$t_{47}$	pogłębianie się zmian we wczesnej blaszce miażdżycowej
$t_{22}$	proces przylegania monocytów do śródbłonna za pośrednictwem ICAM-1	$t_{48}$	aktywacja śródbłonna naczyniowego wywołana przez NO
$t_{23}$	procesy prowadzące do uszkodzenia blaszki miażdżycowej	$t_{49}$	synteza konstytutywna NO pod wpływem eNOS
$t_{24}$	kliniczne objawy miażdżycy	$t_{50}$	pogłębianie się zmian w zaawansowanej blaszce miażdżycowej
$t_{25}$	reakcja Fentona katalizowana przez żelazo		

#### 6.4.1.2. Opis modelu udziału stresu oksydacyjnego w powstawaniu i rozwoju miażdżycy

Model przedstawiony na rycinie 62. jest prezentacją wybranych zjawisk biochemicznych zachodzących w trakcie udziału stresu oksydacyjnego w procesie powstawania i rozwoju miażdżycy. Aby proces został uruchomiony w sześciu miejscach w sieci muszą znajdować się tokeny (znaczniki), tj. po dwa tokeny w miejscach:  $p_{21}$  (wysoce toksyczny rodnik hydroksylowy (OH•)),  $p_{22}$  (jony żelazowe (Fe<sup>3+</sup>)),  $p_{23}$  (jony żelazawe (Fe<sup>2+</sup>)),  $p_{25}$  (nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)),  $p_{26}$  (anion hydroksylowy (OH<sup>-</sup>)), oraz jeden znacznik w  $p_{38}$  (L-cytrulina). Są to tzw. oznakowania początkowe sieci i odpowiadają fizjologicznemu stanowi systemu. Stały dopływ tokenów w kluczowych dla sieci miejscach warunkują tzw. tranzycje wejściowe, których w sieci jest osiem, tj.  $t_5$  (ekspresja CCR2),  $t_{10}$  (zjawisko glikacji),  $t_{15}$  (wpływ diety bogatej w cholesterol),  $t_{17}$  (synteza M-CSF przez komórki śródbłonna i komórki mięśni gładkich naczyń),  $t_{28}$  (reakcje szlaku pentozofosforanowego, w następstwie których powstaje NADPH),  $t_{33}$  (uruchomienie mechanizmów obronnych organizmu aktywujących dysmutazę ponadtlenkową),  $t_{37}$  (proces zapalny),  $t_{39}$  (uruchomienie mechanizmów obronnych organizmu aktywujących katalazę) i  $t_{49}$  (synteza konstytutywna NO pod wpływem eNOS). Ponadto w modelu znajdują się cztery tranzycje wyjściowe, które odpowiadają końcowym zdarzeniom, do których dąży modelowany proces, tj.  $t_{30}$  (dostarczenie atomów wodoru i elektronów potrzebnych do syntez nowych związków przez NADP+),  $t_{40}$  (zużycie wody),  $t_{47}$  (pogłębianie się zmian we wczesnej blaszce miażdżycowej) i  $t_{50}$  (pogłębianie się zmian w zaawansowanej blaszce miażdżycowej).

Aby pojawiło się zjawisko stresu oksydacyjnego w modelu, muszą zostać odpalone tranzycje  $t_{27}$  i  $t_{35}$ , które odpowiadają procesom powstawania anionorodnika ponadtlenkowego. To z kolei prowadzi do pojawienia się znacznika w miejscu  $p_{24}$  (anionorodnik ponadtlenkowy), które jest miejscem logicznym, tj. występuje co najmniej dwa razy w sieci. Znacznik w miejscu  $p_{24}$  jest potrzebny

do uruchomienia dwóch tranzycji, tj.  $t_{34}$  (reakcja zachodząca przy udziale NO i anionorodnika ponadtlenkowego) oraz reakcji  $t_{29}$ , tj. redukcji żelaza  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$ , która zostanie jednak uruchomiona tylko wtedy, gdy obok znacznika w  $p_{24}$ , będzie także obecny znacznik w miejscu  $p_{22}$  (jony żelazowe ( $Fe^{3+}$ )). Początkowo obecność znacznika w miejscu  $p_{22}$  została zapewniona w sieci dzięki znakowaniu początkowemu, wkrótce jednak, jeśliby nie została odpalona tranzycja  $t_{25}$  (reakcja Fentona) proces w tym miejscu zatrzyma się. Podobnie stanie się wtedy, gdy zabraknie tokenów w miejscu  $p_{24}$ . Aby tak się nie stało w tym drugim przypadku, w sieci zabezpieczono stały dopływ tokenów do miejsca  $p_{24}$  poprzez tranzycję wejściową  $t_{35}$ . Z kolei, aby w sieci stale wypływały tokeny z miejsca  $p_{25}$  niezbędne do odpalenia tranzycji  $t_{25}$  musi zajść proces  $t_{31}$ , tj. reakcja katalizowana przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD). Reakcja ta zajdzie w sieci tylko wtedy, gdy zostaną uruchomione mechanizmy obronne organizmu, tj. odpalona zostanie tranzycja wejściowa  $t_{33}$ , która warunkuje stały napływ tokenów do miejsca  $p_{30}$  (dysmutaza ponadtlenkowa) dla podtrzymywania reakcji  $t_{31}$ . Tak więc dwa tokeny, które wypłyną z miejsc  $p_{23}$  (jony żelazowe ( $Fe^{2+}$ )) i  $p_{25}$  (nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ )) są warunkiem niezbędnym, aby w sieci została odpalona tranzycja  $t_{25}$ , w której następstwie pojawiają się wspomniane jony żelazowe, jon wodorotlenowy ( $p_{26}$ ) oraz wysoce toksyczny rodnik hydroksylowy ( $p_{21}$ ). Obecność tokenów w miejscu  $p_{25}$  nie oznacza automatycznie zachodzenia reakcji Fentona, ponieważ może się zdarzyć, że znaczniki z tego miejsca zostaną wykorzystane do zajścia reakcji katalizowanej przez katalazę ( $t_{38}$ ), w wyniku której w sieci pojawi się  $p_{34}$  (cząsteczka tlenu) i  $p_{34}$  (woda). To, która ze wspomnianych reakcji zajdzie, jest w sieciach Petriego wyborem losowym, opartym na rachunku prawdopodobieństwa. Token znajdujący się w miejscu  $p_{34}$  może zostać wykorzystany do odpalenia dwóch tranzycji, tj.  $t_{44}$  (reakcja katalizowana przez iNOS), w wyniku której pojawią się znaczniki w miejscach  $p_{41}$  (tlenek azotu) oraz  $p_{28}$  (NADP+) albo tranzycji  $t_{27}$  (proces katalizowany przez oksydazę NADPH), w następstwie której w sieci pojawi się dodatkowy anionorodnik ponadtlenkowy ( $p_{24}$ ). Jednoczesna obecność znacznika w tym miejscu oraz w miejscu  $p_{41}$  umożliwi odpalenie tranzycji  $t_{34}$ , niezbędnej do pojawienia się nadtlenoazotynu ( $p_{31}$ ) w sieci oraz będącej jednym z kilku możliwych źródeł znaczników dla cytokin ( $p_{35}$ ) (obok  $t_{41}$  tj. aktywacja iNOS pod wpływem cytokin uwalnianych w wyniku degranulacji mastocytów pod wpływem anionorodnika ponadtlenkowego,  $t_{13}$  (wydzielanie przez komórki piankowate czynnika zewnętrznego, MMPs oraz stymulacja uwalniania cytokin)).  $p_{31}$  jest miejscem logicznym i token w nim się znajdujący może zostać wykorzystany do uruchomienia tranzycji  $t_{36}$ , tj. peroksydacji lipidów oraz do uruchomienia  $t_{42}$ , tj. aktywacji iNOS, ale tylko wtedy w tym drugim przypadku, jeśli istnieje token w miejscu  $p_{35}$ , tj. cytokiny. Cytokiny w sieci pojawiają się w wyniku przepływu tokena z  $p_{24}$ , którego obecność w tym miejscu umożliwi zajście reakcji aktywacji iNOS pod wpływem cytokin uwalnianych w wyniku degranulacji mastocytów pod wpływem anionorodnika ponadtlenkowego ( $t_{41}$ ) oraz wskutek

uruchomienia tranzycji  $t_{13}$ , warunkującej wydzielanie przez komórki piankowe czynnika zewnętrznego, MMPs oraz odpowiadającej za stymulację uwalniania cytokin z komórek piankowatych ( $p_{12}$ ).

Odpalenie tranzycji  $t_{13}$  przyczynia się w konsekwencji do uruchomienia procesów prowadzących do uszkodzenia blaszki miażdżycowej ( $t_{23}$ ) i klinicznych objawów miażdżycy ( $t_{24}$ ). Tranzycja  $t_{24}$  jest tranzycją wyjściową. Aby pojawiły się w sieci komórki piankowe ( $p_{12}$ ), musi zostać uruchomiona tranzycja  $t_{12}$ , tj. przekształcanie makrofagów obciążonych CE w komórki piankowe, odpowiadająca za przepływ znacznika z miejsca  $p_8$  (cząsteczki lipoprotein zmodyfikowane przez oksydację) poprzez  $t_8$  (łączenie zmodyfikowanych lipoprotein i receptorów zmiatających znajdujących się na powierzchni komórek jednojądrzastych),  $p_9$  (kompleksy zmodyfikowanych lipoprotein połączonych z receptorami typu *scavenger* na powierzchni makrofagów) do  $t_{12}$ . Przepływ tokenów z  $p_{12}$  odbywa się dwutorowo. Z jednej strony zasilają one miejsce  $p_{17}$  (ciała apoptotyczne) poprzez uruchomienie tranzycji  $t_{18}$  (przekształcenie komórek piankowatych w ciała apoptotyczne), co w konsekwencji prowadzi do pogłębiania uszkodzenia śródbłonna i progresji miażdżycy ( $p_{39}$ ). Z drugiej strony stanowią one źródło tokenów potrzebnych dla odpalenia  $t_{26}$  (aktywacja oksydazy NADPH) i pojawienia się oksydazy NADPH ( $p_{27}$ ) w sieci. Uruchomienie procesów katalizowanych przez oksydazę NADPH ( $t_{27}$ ) jest w sieci możliwe tylko wtedy, gdy jednocześnie napłyną tokeny do miejsc  $p_{27}$  (oksydaza NADPH) i  $p_{29}$  (NADPH). Uruchomienie tranzycji  $t_{27}$  (procesy katalizowane przez oksydazę NADPH) stanowi źródło dla przepływu tokenów do  $p_{24}$  (anion ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ )) oraz  $p_{28}$  (NADP<sup>+</sup>) i  $p_{37}$  (kation wodorowy).

Ważnym miejscem logicznym w sieci jest miejsce  $p_8$ , któremu odpowiadają cząsteczki lipoprotein modyfikowane przez oksydację. Pojawienie się znacznika w tym miejscu umożliwia, obok wspomnianego uruchomienia tranzycji  $t_8$ , odpalenie tranzycji  $t_{16}$  (ekspresja MCP-1) i umożliwia w ten sposób pojawienie się w sieci cząsteczki MCP-1 ( $p_{16}$ ). Tokeny niezbędne do uruchomienia tranzycji  $t_4$  (łączenie MCP-1 z CCR2) monocyty nabywają własności makrofagów tkankowych) napływają jednocześnie z miejsc  $p_5$  (CCR2) i  $p_{16}$  (MCP-1), i umożliwiają uruchomienie tranzycji  $t_4$  (łączenie MCP-1 z CCR2), poprzez którą następuje przepływ tokenów do miejsca  $p_4$  (monocyty w błonie środkowej).

Należy podkreślić, że zgodnie z zasadą aktywacji tranzycji, tranzycja  $t_8$  uruchomi się tylko wtedy, gdy napłyną do niej równocześnie znaczniki z trzech miejsc, czyli  $p_7$  (makrofagi z receptorami zmiatającymi SRA lub CD36 na swojej powierzchni),  $p_8$  (cząsteczki lipoprotein zmodyfikowane przez oksydację) oraz  $p_{10}$  (cząsteczki lipoprotein zmodyfikowane przez glikację). Z kolei obecność tokena w miejscu  $p_7$  (makrofagi z receptorami typu *scavenger* (SRA, CD36)) zależy od tego, czy znaczniki znajdują się w miejscu  $p_{35}$  (cytokiny), bo jeśli tak – to uruchomią one tranzycję  $t_{19}$  – odpowiednik stymulacji śródbłonna do syntezy białek adhezyjnych i w konsekwencji spowodują napływ znaczników do miejsca  $p_2$  (cząstecz-

ki adhezyjne VCAM-1). Pojawienie się tokenów w miejscu  $p_2$  zależy głównie od pobudzenia śródbłonka do syntezy cząsteczek adhezyjnych ( $t_{19}$ ), aktywacji śródbłonka przez proces zapalny ( $t_0$ ), ale także od wpływu diety bogatej w cholesterol ( $t_{15}$ ). Warunkuje ono uruchomienie reakcji  $t_2$  (wczesna rekrutacja leukocytów i ich napływ do tworzących się zmian miażdżycowych, proces przylegania monocytów do śródbłonka – łączenie VCAM-1 i VLA4) lub  $t_{20}$  (transdukcja sygnałów pomiędzy leukocytami i komórkami śródbłonka pod wpływem VCAM-1), które obok  $t_{21}$  (proces przylegania monocytów do śródbłonka za pośrednictwem selektyny E) i  $t_{22}$  (proces przylegania monocytów do śródbłonka za pośrednictwem ICAM-1) stanowią źródło napływu tokenów do miejsca  $p_3$  (leukocyty wcześniej napływające do zmienionego śródbłonka). Tokeny obecne w miejscu  $p_3$  służą do uruchomienia tranzycji  $t_3$  (penetracja monocytów do błony środkowej naczyń) i po kolei kilku tranzycji połączonych ze sobą ciągiem przyczynowo-skutkowym, tj.  $t_6$  (monocyty nabywają własności makrofagów tkankowych),  $t_7$  (ekspresja receptorów zmiatających) i  $t_8$  (łączenie zmodyfikowanych lipoprotein i receptorów zmiatających znajdujących się na powierzchni komórek jednojądrzastych). Zmodyfikowane przez oksydację cząsteczki lipoprotein – miejsce  $p_8$  to miejsce logiczne i pojawia się dwukrotnie w sieci (jeden raz jako źródło znaczników dla tranzycji  $t_{19}$  (pobudzenie śródbłonka do syntezy cząsteczek adhezyjnych), drugi raz jako źródło tokenów niezbędnych do uruchomienia tranzycji  $t_8$  (łączenie zmodyfikowanych lipoprotein i receptorów zmiatających znajdujących się na powierzchni komórek jednojądrzastych). Aby tokeny znalazły się w miejscu  $p_8$ , muszą zostać uruchomione tranzycje  $t_{36}$  (peroksydacja lipidów pod wpływem nadtlenoazotyenu) lub  $t_9$  (peroksydacja lipidów poprzez rodnik hydroksylowy). Tranzycja  $t_{36}$ , uruchamia się tylko wtedy, gdy obecne są jednocześnie tokeny w miejscu  $p_{29}$  (NADPH) i miejscu  $p_{31}$  (nadtlenoazotyn (OONO<sup>-</sup>)).

Proces zapalny pojawia się w sieci dzięki uruchomieniu tranzycji wejściowej  $t_{37}$ , która zapewnia stały dopływ znaczników do sieci, co z kolei uruchamia tranzycje  $t_0$  (aktywacja komórek śródbłonka przez proces zapalny) i  $t_1$  (zwiększona ekspresja cząsteczek adhezyjnych leukocytów).

#### 6.4.1.3. Analiza modelu udziału stresu oksydacyjnego w powstawaniu i rozwoju miażdżycy

##### **Analiza strukturalna**

Model przedstawiony na rycinie jest dyskretną (nieciągłą) siecią Petriego, w której miary na wszystkich łukach są równe 1. Tego rodzaju modele można analizować za pomocą odpowiednich metod matematycznych i informatycznych, opisanych szczegółowo w podrozdziale 5.2.4., których wykorzystanie umożliwia odkrycie pewnych własności modelowanego systemu biologicznego. Innymi słowy, na podstawie analizy własności zaproponowanego modelu formalnego można dokonać odkryć dotyczących własności odpowiadającego mu procesowi biologicznego.

Zaproponowany model nie zawiera informacji na temat szybkości zachodzenia reakcji/procesów ani na temat biochemicznych stężeń/aktywności poszczególnych substancji/cząsteczek biorących w nim udział. Stąd, nie dostarcza on informacji na temat zależności ilościowych, lecz jedynie na temat zależności jakościowych występujących w modelowanym procesie.

Wybrane własności strukturalne modelu zebrano w tabeli 44.

**Tabela 44.** Wybrane własności strukturalne modelu przedstawionego na rycinie 62

Własność sieci	Opis
Zwyczajność	Sieć jest zwyczajna, ponieważ na wszystkich łukach waga jest równa 1.
Jednorodność	Wagi łuków wyjściowych dla każdego miejsca są takie same.
Czystość	Sieć nie ma łuków odczytu.
Zachowawczość	Sieć nie jest zachowawcza, znajdują się w niej tranzycje, których suma wag na wejściowych łukach nie jest równa sumie wag na łukach wyjściowych.
Ograniczoność	Sieć nie jest ograniczona, ponieważ łączy się z „zewnątrznym światem” poprzez tranzycje początkowe i końcowe. Tranzycje początkowe zapewniają stały dopływ znaczników do zajścia reakcji. Nie ma więc ograniczeń jeśli chodzi o ilość znaczników w sieci.
Obecność t-niezmienników	Sieć zawiera 42 minimalne t-niezmienniki ( $x_1-x_{42}$ ).
Pokrycie sieci przez t-niezmienniki	Sieć jest pokryta przez t-niezmienniki.
Obecność p-niezmienników	Sieć zawiera 2 minimalne p-niezmienniki ( $y_1-y_2$ ).
Pokrycie sieci przez p-niezmienniki	Sieć nie jest pokryta przez p-niezmienniki, co jest prawidłową własnością sieci w sytuacji gdy sieć nie jest ograniczona.

### Analiza niezmienników (inwariantów)

Model zawiera jedynie dwa p-niezmienniki ( $y_1-y_2$ ), których charakterystykę przedstawiono w tabeli 45. Niezmienniki te reprezentują dwie cykliczne przemiany zachodzące w sieci, tj. procesy utleniania i redukcji żelaza oraz reakcje katalizowane przez iNOS.

**Tabela 45.** Charakterystyka p-niezmienników sieci przedstawionej na rycinie 62

p-niezmienniki	Miejsca	Charakterystyka
$y_1$	$p_{22}, p_{23}$	redukcja i utlenianie żelaza
$y_2$	$p_{36}, p_{38}$	cykl cytrulina/L-arginina

Model jest pokryty przez 42 minimalne t-niezmienniki ( $x_1-x_{42}$ ) przedstawione w tabeli 46. jako suma zbiorów MCT i pojedynczych tranzycji, które nie znalazły się w zbiorach MCT. Pokrycie sieci przez t-niezmienniki oznaczają, że wszystkie tranzycje są istotne dla zachowania równowagi w sieci. Jeśli by tak nie było, oznaczałoby to, że w sieci są miejsca, w których dochodzi do gromadzenia

**Tabela 46.** T-niezmienniki (suma zbiorów MCT i pojedynczych tranzycji, które nie znalazły się w zbiorach MCT) pogrupowane w sześć klastrów uzyskanych przy wykorzystaniu algorytmu UPG-MA i ustalonego doświadczalnie punktu odcięcia [77]

t-niezmienniki = [zbiory MCT + pojedyncze tranzycje, które nie znalazły się w zbiorach MCT]	Zbiory MCT	Pojedyncze tranzycje, które nie znalazły się w zbiorach MCT	t-klasy
$x_1$	$m_1, m_4, m_9$	$t_6, t_{34}, t_{42}$	C <sub>1</sub>
$x_2$	$m_1, m_2, m_5, m_9$	$t_2, t_3, t_6, t_{34}, t_{42}$	
$x_3$	$m_1, m_2, m_5, m_9$	$t_3, t_6, t_{20}, t_{34}, t_{42}$	
$x_4$	$m_1, m_5, m_8, m_9$	$t_2, t_3, t_6, t_{34}, t_{36}, t_{42}, t_{49}, t_{50}$	
$x_5$	$m_1, m_5, m_8, m_9$	$t_3, t_6, t_{20}, t_{34}, t_{36}, t_{42}, t_{49}, t_{50}$	
$x_6$	$m_1, m_5, m_8, m_9$	$t_2, t_3, t_6, t_{34}, t_{36}, t_{41}, t_{42}, t_{50}$	
$x_7$	$m_1, m_5, m_8, m_9$	$t_3, t_6, t_{20}, t_{34}, t_{36}, t_{41}, t_{42}, t_{50}$	
$x_8$	$m_1, m_5, m_8, m_9$	$t_2, t_3, t_6, t_{34}, t_{41}, t_{42}, t_{48}, t_{50}$	
$x_9$	$m_1, m_5, m_8, m_9$	$t_3, t_6, t_{20}, t_{34}, t_{41}, t_{42}, t_{48}, t_{50}$	
$x_{10}$	$m_1, m_8, m_9$	$t_2, t_3, t_6, t_{15}, t_{34}, t_{42}, t_{50}$	
$x_{11}$	$m_1, m_8, m_9$	$t_3, t_6, t_{15}, t_{34}, t_{42}, t_{50}$	
$x_{12}$	$m_1, m_6, m_7, m_9$	$t_{34}, t_{42}$	
$x_{13}$	$m_1, m_6, m_9$	$t_2, t_3, t_6, t_{15}, t_{34}, t_{42}$	
$x_{14}$	$m_1, m_6, m_9$	$t_3, t_6, t_{15}, t_{20}, t_{34}, t_{42}$	
$x_{15}$	$m_1, m_5, m_6, m_9$	$t_2, t_3, t_6, t_{34}, t_{36}, t_{42}, t_{49}$	
$x_{16}$	$m_1, m_5, m_6, m_9$	$t_3, t_6, t_{20}, t_{34}, t_{36}, t_{42}, t_{49}$	
$x_{17}$	$m_1, m_5, m_6, m_9$	$t_2, t_3, t_6, t_{34}, t_{36}, t_{41}, t_{42}$	
$x_{18}$	$m_1, m_5, m_6, m_9$	$t_3, t_6, t_{20}, t_{34}, t_{36}, t_{41}, t_{42}$	
$x_{19}$	$m_1, m_5, m_6, m_9$	$t_2, t_3, t_6, t_{34}, t_{41}, t_{42}, t_{48}, t_{50}$	
$x_{20}$	$m_1, m_5, m_6, m_9$	$t_3, t_6, t_{20}, t_{34}, t_{41}, t_{42}, t_{48}, t_{50}$	
$x_{21}$	$m_1, m_3, m_6, m_9$	$t_2, t_3, t_6, t_{34}, t_{42}$	
$x_{22}$	$m_1, m_3, m_6, m_9$	$t_3, t_6, t_{20}, t_{34}, t_{42}$	
$x_{23}$	$m_1, m_7, m_8, m_9$	$t_{34}, t_{42}, t_{50}$	
$x_{24}$	$m_1, m_2, m_5, m_7, m_9, m_{10}$	$t_2, t_{34}, t_{42}$	
$x_{25}$	$m_1, m_2, m_5, m_7, m_9, m_{10}$	$t_{20}, t_{34}, t_{42}$	
$x_{26}$	$m_1, m_3, m_8, m_9$	$t_2, t_3, t_6, t_{34}, t_{42}, t_{50}$	
$x_{27}$	$m_1, m_3, m_8, m_9$	$t_3, t_6, t_{20}, t_{34}, t_{42}, t_{50}$	
$x_{28}$	$m_1, m_5, m_9, m_{10}$	$t_2, t_3, t_6, t_{34}, t_{36}, t_{41}$	
$x_{29}$	$m_1, m_5, m_7, m_9, m_{10}$	$t_2, t_{34}, t_{36}, t_{41}$	
$x_{30}$	$m_1, m_5, m_9, m_{10}$	$t_3, t_6, t_{20}, t_{34}, t_{36}, t_{41}$	
$x_{31}$	$m_1, m_5, m_9, m_{10}$	$t_{20}, t_{34}, t_{36}, t_{41}$	
$x_{32}$	$m_1, m_5, m_7, m_9, m_{10}$	$t_2, t_3, t_6, t_{41}, t_{48}, t_{50}$	
$x_{33}$	$m_1, m_5, m_9, m_{10}$	$t_3, t_6, t_{20}, t_{41}, t_{48}, t_{50}$	
$x_{34}$	$m_1, m_5, m_7, m_9, m_{10}$	$t_2, t_{41}, t_{48}, t_{50}$	
$x_{35}$	$m_1, m_5, m_7, m_9, m_{10}$	$t_{20}, t_{41}, t_{48}, t_{50}$	
$x_{36}$	$m_{10}$	$t_2, t_{15}$	C <sub>3</sub>
$x_{37}$	$m_{10}$	$t_{15}, t_{20}$	C <sub>4</sub>
$x_{38}$	$m_5, m_9, m_{10}$	$t_2, t_{34}, t_{36}, t_{49}$	
$x_{39}$	$m_5, m_9, m_{10}$	$t_{20}, t_{34}, t_{36}, t_{49}$	

cd. tabeli 46.

t-niezmienniki = [zbiory MCT + pojedyncze tranzycje, które nie znalazły się w zbiorach MCT]	Zbiory MCT	Pojedyncze tranzycje, które nie znalazły się w zbiorach MCT	t-klastry
$x_{40}$	$m_3, m_{10}$	$t_2$	$c_5$
$x_{41}$	$m_3, m_{10}$	$t_{20}$	
$x_{42}$	–	$t_{48}, t_{49}, t_{50}$	$c_6$

się w nieskończoność znaczników. Model nie zawiera luków odczytu, tzn. takich połączeń, w których substrat nie jest wcale zużywany i dlatego wspomniane t-niezmienniki są jednocześnie niezmiennikami wykonywalnymi.

Wspomniane zbiory MCT tworzy się w celu ułatwienia analiz, co jest szczególnie istotne w przypadku rozbudowanych sieci, tj. takich z dużą liczbą tranzycji. Zbiory MCT obliczono wykorzystując algorytm opisany m.in. w [95]. Większość t-tranzycji uszeregowano w 10 zbiorów MCT ( $m_1$ – $m_{10}$ ), a ich charakterystykę biologiczną zamieszczono w tabeli 47. Te tranzycje, które nie znalazły się w zbiorach MCT zostały przedstawione w tabeli 46.

Każdy z t-niezmienników odpowiada biologicznym procesom. Aby było łatwiej nadać im biologiczny sens, szczególnie przy dużej liczbie t-niezmienników, jak miało to miejsce w przypadku analizowanego modelu, grupuje się te niezmienniki w klastry. Klastry są odpowiednikami podprocesów i powinny być możliwie jak najbardziej homogenne. W celu określenia optymalnej liczby klastrów wykorzystano, w przypadku prezentowanego modelu, standardowy algorytm *UPGMA* opierający się na metodzie średnich połączeń i ustalono współczynnik odcięcia

**Tabela 47.** Charakterystyka zbiorów MCT sieci przedstawionej na rycinie 52

Zbiory MCT	Tranzycje	Charakterystyka
$m_1$	$t_7, t_8, t_9, t_{10}, t_{12}, t_{25}, t_{26}, t_{27}, t_{29}, t_{30}, t_{31}, t_{32}, t_{33}, t_{44}, t_{46}$	zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej, skutkujące modyfikacjami lipidów, następowym wychwytywaniem ich przez receptory zmiatające komórki jednojądrzaste i powstawaniem komórek piankowatych
$m_2$	$t_{13}, t_{14}, t_{23}, t_{44}, t_{46}$	procesy prowadzące do pojawienia się klinicznych objawów miażdżycy
$m_3$	$t_0, t_1, t_{37}$	synteza VCAM-1 przez zmieniony zapalnie śródbłonek naczyńnowy
$m_4$	$t_4, t_5, t_{16}$	wiązanie MCP-1 z CCR2
$m_5$	$t_{19}, t_{21}, t_{22}$	napiływ coraz większej ilości monocytów w okolice zmienionego zapalnie śródbłoneka naczyniowego i przyleganie ich do śródbłoneka pod wpływem selektywnych E oraz ICAM-1
$m_6$	$t_{38}, t_{39}, t_{40}$	rozkład nadtlenu wodoru do wody i tlenu odbywający się pod wpływem katalazy
$m_7$	$t_{11}, t_{17}$	stymulacja kolonii makrofagów pod wpływem M-CSF
$m_8$	$t_{18}, t_{45}$	przekształcenie komórek piankowatych w ciała apoptotyczne
$m_9$	$t_{28}, t_{35}$	synteza anionorodnika nadadtlenkowego NADPH zależna
$m_{10}$	$t_{43}, t_{47}$	pogłębianie się zmian we wczesnej blaszce miażdżycowej, głównie wywołane infiltracją leukocytów

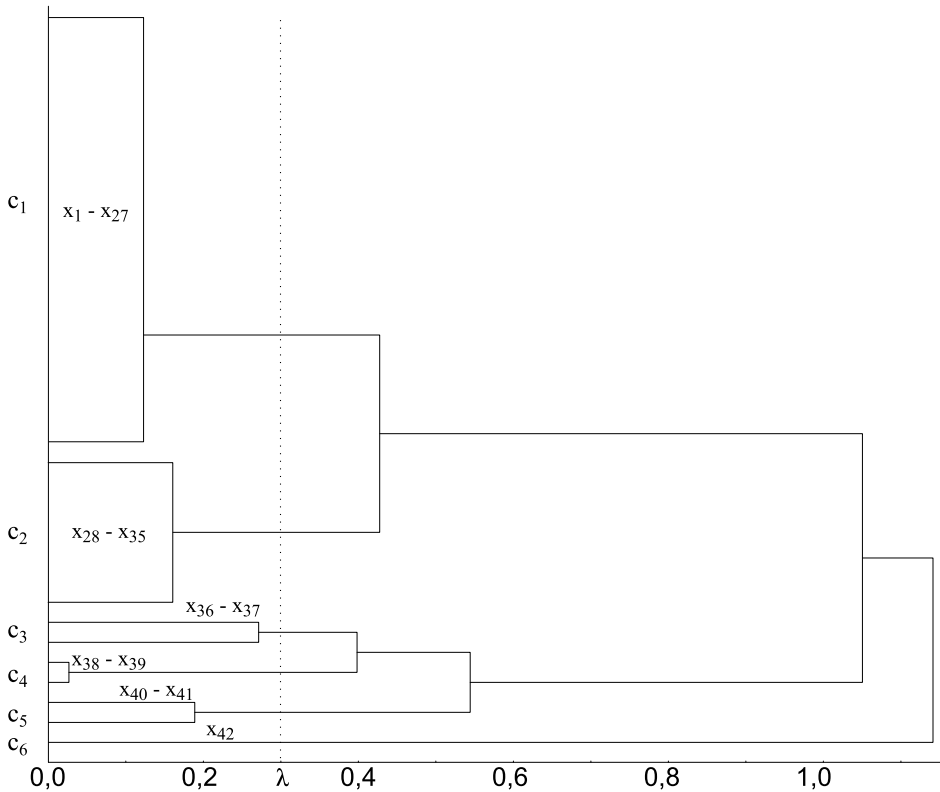
w dendrogramie na poziomie  $\lambda = 0,3$  (rycina 63). Pozwoliło to na wygenerowanie sześciu klastrów ( $c_1$ – $c_6$ ), którym przypisano znaczenie biologiczne. Dendrogram przedstawiono na rycinie 63., a charakterystykę biologiczną poszczególnych klastrów zebrano w tabeli 48.

Odległość pomiędzy dwoma grupami klastrów, tj.  $c_1$ – $c_2$  oraz  $c_3$ – $c_6$  jest bliska 1, co oznacza, że nie ma istotnych statystycznie zależności pomiędzy tymi dwoma grupami klastrów. W składzie klastrów  $c_1$  i  $c_2$  znalazł się największy zbiór MCT, tj.  $m_1$ , który zawiera transzycje odpowiedzialne za zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej, skutkujące modyfikacjami lipidów, następowym wychwytywaniem ich przez receptory zmiatające komórki jednojądrzastych i powstawaniem komórek piankowatych, stymulowanych obecnością nadtlenuazotynu. W obu klastrach, obok  $m_1$ , znalazł się także dwuelementowy zbiór MCT –  $m_9$ , odpowiadający NADPH zależnej syntezie anionorodnika ponadtlenkowego. Ponadto w skład klastra  $c_1$ , co miało miejsce w przypadku każdego t-niezmiennika tego klastra, weszły dwie transzycje, tj.  $t_{34}$  (reakcja powstawania nadtlenuazotynu zachodząca przy udziale NO i anionorodnika ponadtlenkowego) i  $t_{42}$  (aktywacja

**Tabela 48.** Charakterystyka t-klastrów

Klaster	Charakterystyka
$c_1$	konkurowanie NO i SOD o anionorodnik ponadtlenkowy, zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej powodują przesunięcie równowagi w kierunku wykorzystania anionorodnika ponadtlenkowego przez NO w zwiększonych ilościach syntetyzowanego po wpływie iNOS, co skutkuje powstaniem nadtlenuazotynu, modyfikacjami lipidów, następowym wychwytywaniem ich przez receptory zmiatające komórki jednojądrzastych i powstawaniem komórek piankowatych, uwalnianie cytokin istotnych m.in. dla aktywacji iNOS odbywa się pod wpływem komórek piankowatych, stymulowanych obecnością nadtlenuazotynu
$c_2$	konkurowanie NO i SOD o anionorodnik ponadtlenkowy, zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej powodują przesunięcie równowagi w kierunku wykorzystania anionorodnika ponadtlenkowego przez NO w zwiększonych ilościach syntetyzowanego po wpływie iNOS, co skutkuje powstaniem nadtlenuazotynu, modyfikacjami lipidów, następowym wychwytywaniem ich przez receptory zmiatające komórki jednojądrzastych i powstawaniem komórek piankowatych, uwalnianie cytokin istotnych m.in. dla aktywacji iNOS odbywa się pod degranulacji komórek tucznych, napływa coraz większa ilość monocytów w okolice zmienionego zapalnie śródbłonka naczyniowego i przyleganie ich do śródbłonka pod wpływem selektyn E oraz ICAM-1
$c_3$	pogłębianie się zmian we wczesnej blaszce miażdżycowej wywołane infiltracją leukocytów, zarówno proces przylegania monocytów do śródbłonka za pośrednictwem VCAM-1 jak i wczesna rekrutacja leukocytów i ich napływ do tworzących się zmian miażdżycowych z łączeniem VCAM-1 i VLA4 odbywają się przy udziale diety bogatej w cholesterol
$c_4$	napływ coraz większej ilości monocytów w okolice zmienionego zapalnie śródbłonka naczyniowego i przyleganie ich do śródbłonka pod wpływem selektyn E oraz ICAM-1, co odbywa się przy udziale peroksydacji lipidów wywołanej przez nadtlenuazotyn i przyczynia się do postępu miażdżycy
$c_5$	progresja miażdżycy pod wpływem procesu zapalnego, który stymuluje komórki śródbłonka do wczesnej rekrutacji leukocytów i ich napływu do tworzących się zmian miażdżycowych, następuje łączenie VCAM-1 i VLA4 oraz dochodzi pod wpływem VCAM-1 do transdukcji sygnałów na linii leukocyty–komórki śródbłonka naczyniowego
$c_6$	aktywacja śródbłonka pod wpływem NO i pogłębianie się zmian w zaawansowanej blaszce miażdżycowej





**Rycina 63.** Dendrogram t-niezmienników ( $x_1-x_{42}$ ) uszeregowanych w sześć klastrow przy wykorzystaniu standardowego algorytmu do grupowania (UPGMA), współczynnik odcięcia  $\lambda$  został ustalony doświadczalnie w ten sposób, aby otrzymane klastry miały sens biologiczny [77].

iNOS pod wpływem cytokin uwalnianych przez komórki piankowate). Oznacza to, że te dwie transzycje są szczególnie istotne dla podprocesu, którego reakcje (transzycje) znalazły się w tym klastrze. Należy zauważyć, że transzycja  $t_{42}$  stanowi element różnicujący te dwa bardzo podobne do siebie klastry  $c_1$  i  $c_2$  i nie weszła w skład żadnego niezmiennika innego klastra. Z kolei, w składzie wszystkich t-niezmienników klastra  $c_2$ , obok wspomnianych zbiorów  $m_1$  i  $m_9$ , znalazł się zbiór  $m_5$ , tj. napływ coraz większej ilości monocytów w okolice zmienionego zapalnie śródbłonka naczyń i przyleganie ich do śródbłonka pod wpływem selektyn E oraz ICAM-1. Pojedyncza transzycja, tj.  $t_{41}$  odpowiadająca procesowi aktywacji iNOS przy udziale cytokin uwalnianych w wyniku degranulacji mastocytów pod wpływem anionorodnika ponadtlenkowego, która znalazła się we wszystkich t-niezmiennikach klastra  $c_2$ , co przy jednoczesnym braku  $t_{42}$ , różnicuje klastry  $c_1$  i  $c_2$ . Dla omawianych podprocesów zebranych w tych klastrach wydaje się być istotne, w jaki sposób następuje aktywacja iNOS pod wpływem cytokin, tj. czy cytokiny powstają w wyniku degranulacji komórek tucznych, czy pod wpływem cytokin uwalnianych przez komórki piankowate.

Z kolei następane trzy klastry, tj.  $c_3, c_4$  i  $c_5$ , reprezentują procesy prowadzące do pogłębiania się zmian we wczesnej blaszce miażdżycowej (każdy z t-niezmienników zawiera zbiór tranzycji  $m_{10}$ ). Ponadto, t-niezmienniki zgrupowane w klastrze  $c_3$  w swojej strukturze zawierają tranzycję  $t_{15}$  odpowiadającą wpływowi diety bogatej w cholesterol, oraz jedną z dwóch tranzycji, tj.  $t_{20}$  (transdukcja sygnałów pomiędzy leukocytami i komórkami śródbłonna pod wpływem VCAM-1) lub  $t_2$  (wczesna rekrutacja leukocytów i ich napływ do tworzących się zmian miażdżycowych, proces przylegania monocytów do śródbłonna – łączenie VCAM-1 i VLA4). Wpływ diety bogatej w cholesterol ( $t_{15}$ ), który w modelowanym systemie odpowiada zaburzeniom metabolizmu lipidów, obok  $m_{10}$  i  $t_2$ , świadczy o silnym związku pomiędzy tymi zamodelowanymi procesami, czyli pogłębianie się zmian we wczesnej blaszce miażdżycowej wywołane infiltracją leukocytów, proces przylegania monocytów do śródbłonna za pośrednictwem VCAM-1, a także wczesna rekrutacja leukocytów i ich napływ do tworzących się zmian miażdżycowych z łączeniem VCAM-1 i VLA4 odbywają się w obecności zaburzeń metabolizmu lipidów. Jest to o tyle istotne, że tranzycja  $t_{15}$  pojawia się jedynie w klastrze  $c_3$  oraz w przypadku czterech t-niezmienników ( $x_{10}, x_{11}, x_{13}, x_{14}$ ) zgrupowanych w klastrze  $c_1$ . Cechą charakterystyczną tych niezmienników jest ich podobna budowa. Wszystkie z nich opierają się na trzech zbiorach MCT, spośród których dwa są takie same, tj.  $m_1$  (zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej) i  $m_9$  (synteza anionorodnika ponadtlenkowego) oraz na pojedynczych tranzycjach, z których pięć, tj.  $t_3, t_6, t_{15}, t_{34}, t_{42}$  jest wspólnych. Wynika z tego fakt, że w przypadku zaburzeń lipidowych może zachodzić penetracja monocytów do błony środkowej naczyń ( $t_3$ ), procesy związane z nabywaniem własności makrofagów tkankowych ( $t_6$ ), choć te zaburzenia lipidowe nie są warunkiem niezbędnym dla ich zaistnienia. W wielu t-niezmiennikach znajdują się bowiem obok siebie tranzycje  $t_3$  i  $t_6$  przy braku  $t_{15}$ . Podsumowując wyniki klastrowania w zakresie klastra  $c_3$ , można pokusić się o stwierdzenie, że być może zaburzenia lipidowe nie są niezbędne dla zapoczątkowania miażdżycy, ale na pewno są kluczowe dla pogłębiania się zmian we wczesnej blaszce miażdżycowej.

Kolejny klaster –  $c_4$  (napływ coraz większej ilości monocytów w okolice zmienionego zapalnie śródbłonna naczyniowego i przyleganie ich do śródbłonna pod wpływem selektyń E oraz ICAM-1, co odbywa się przy udziale peroksydacji lipidów wywołanej przez nadtlenoazotyn i przyczynia się do postępu miażdżycy) opiera się na trzech zbiorach MCT, tj.  $m_5, m_9$  i  $m_{10}$  oraz zawiera wspólne tranzycje:  $t_{34}, t_{36}, t_{49}$ . Obok napływu monocytów w okolice zmienionego zapalnie śródbłonna, syntezy anionorodnika ponadtlenkowego oraz pogłębiania się zmian we wczesnej blaszce miażdżycowej współlistnieją reakcje powstawania nadtlenoazotynu zachodzące przy udziale tlenu azotu, peroksydacja lipidów oraz synteza NO pod wpływem eNOS. Istnieje więc pewna współzależność tych wspomnianych procesów.

Klaster  $c_5$  (progresja miażdżycy pod wpływem procesu zapalnego, który stymuluje komórki śródbłonna do wczesnej rekrutacji leukocytów i ich napływu

do tworzących się zmian miażdżycowych, następuje łączenie VCAM-1 i VLA4 oraz dochodzi pod wpływem VCAM-1 do transdukcji sygnałów na linii leukocyty–komórki śródbłonna naczyniowego) jest małym klastrem składającym się z dwóch t-niezmienników, które są identyczne jeśli chodzi o zbiory MCT, tj. oba opierają się na zbiorach  $m_3$  i  $m_{10}$ , a różnią się pojedynczymi tranzycjami, tj. w jednym występuje tranzycja  $t_2$  (wczesna rekrutacja leukocytów i ich napływ do tworzących się zmian miażdżycowych, proces przylegania monocytów do śródbłonna – łączenie VCAM-1 i VLA4), a w drugim  $t_{20}$  (transdukcja sygnałów pomiędzy leukocytami i komórkami śródbłonna pod wpływem VCAM-1).

Ostatni klaster  $c_6$  (aktywacja śródbłonna pod wpływem NO i pogłębianie się zmian w zaawansowanej blaszce miażdżycowej) jest utworzony przez jeden t-niezmiennik oparty na trzech tranzycjach, tj. aktywacji śródbłonna naczyniowego wywołanej przez NO ( $t_{48}$ ), syntezie konstytutywnej NO pod wpływem eNOS ( $t_{49}$ ) oraz pogłębianiu się zmian w zaawansowanej blaszce miażdżycowej ( $t_{50}$ ).

## 6.4.2. Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego w aspekcie miażdżycy

### 6.4.2.1. Model dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w miażdżycy oparty na sieciach Petriego

W podrozdziale tym zostanie zaprezentowany formalny szczegółowy model udziału dysfunkcji śródbłonna w powstawaniu i rozwoju miażdżycy (Rycina 64) oparty na sieciach Petriego. Model ten stanowi prezentację wspomnianego procesu, opisanego w sposób nieformalny w podrozdziale 2.7.3. Składa się on z 50 miejsc ( $P = \{p_0, p_1, \dots, p_{50}\}$ ) i 51 tranzycji ( $T = \{t_0, t_2, \dots, t_{51}\}$ ). Numery miejsc i tranzycji wraz z przyporządkowanymi im nazwami/charakterystykami zostały przedstawione odpowiednio w tabelach 49. i 50.

**Tabela 49.** Charakterystyka miejsc modelu dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w miażdżycy przedstawionego za pomocą sieci Petriego na rycinie 64

Miejsce	Nazwa miejsca	Miejsce	Nazwa miejsca
$p_0$	niskie stężenie tlenu azotu powstającego w śródbłonna naczyniowym	$p_{26}$	kompleks selektyny P i liganda dla tej selektyny (selektyna P – PGSL-1)
$p_1$	niski wzrost cGMP	$p_{27}$	endotelina 1 (ET-1)
$p_2$	niska aktywacja $Ca^{2+}$ – ATP-azy	$p_{28}$	synteza białka aktywującego płytki (PAF)
$p_3$	słaby rozkurcz komórek mięśni gładkich naczyń	$p_{29}$	PECAM-1
$p_4$	pobudzone makrofagi	$p_{30}$	enzym katalizujący metylację białkowej argininy (PRMT)
$p_5$	ADMA	$p_{31}$	eNOS
$p_6$	NADPH	$p_{32}$	L-cytrulina
$p_7$	L-arginina	$p_{33}$	LDL cholesterol

cd. tabeli 49.

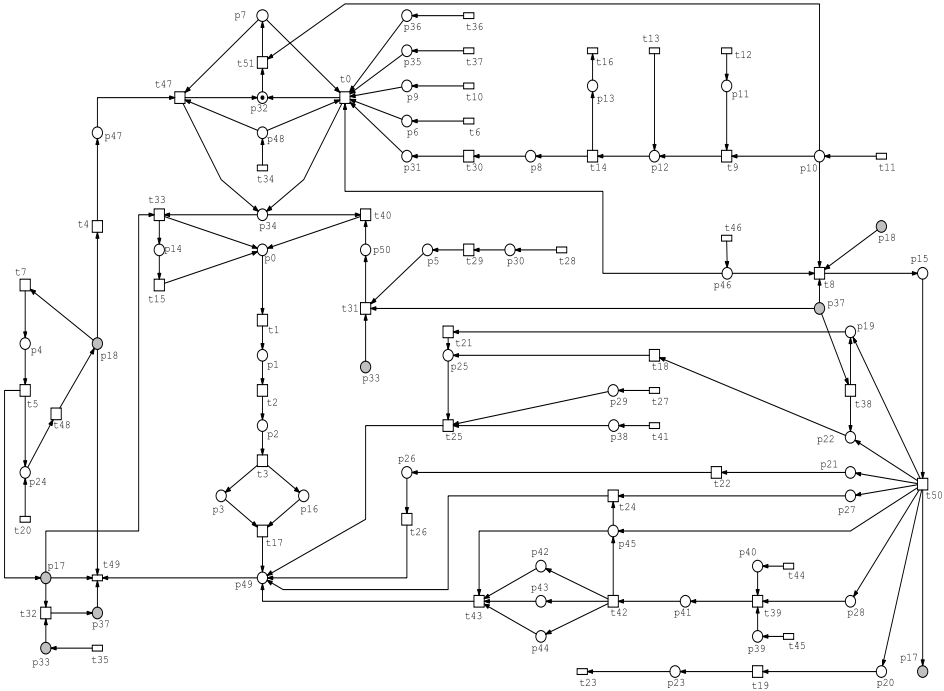
Miejsce	Nazwa miejsca	Miejsce	Nazwa miejsca
$p_8$	kalmodulina	$p_{34}$	tlenek azotu (NO)
$p_9$	tetrahydrobiopteryna	$p_{35}$	FMN
$p_{10}$	duże naprężenia styczne oddziałujące na ściany naczyń krwionośnych	$p_{36}$	FAD
$p_{11}$	agoniści rozszerzający naczynia krwionośne	$p_{37}$	zmodyfikowana cząsteczka LDL (ox-LDL)
$p_{12}$	kompleks kalmodulina–kaweolina	$p_{38}$	białka wewnątrzkomórkowe (m.in. włókna aktyny, czynniki sygnalizacyjne: filamina, paksylina i inne)
$p_{13}$	kaweolina	$p_{39}$	eksponowany czynnik vWf
$p_{14}$	nadtlenoazotyn (OONO)	$p_{40}$	eksponowany kolagen
$p_{15}$	pobudzenie śródbłonka naczyniowego	$p_{41}$	płytki krwi przylegające do śródbłonka naczyniowego
$p_{16}$	silny skurcz komórek mięśni gładkich naczyń	$p_{42}$	ADP
$p_{17}$	ROS	$p_{43}$	serotonina
$p_{18}$	cytokiny	$p_{44}$	ATP
$p_{19}$	ICAM-1	$p_{45}$	podwyższone stężenie tromboksanu
$p_{20}$	selektyny E	$p_{46}$	śródbłonek naczyniowy
$p_{21}$	selektyny P	$p_{47}$	iNOS
$p_{22}$	VCAM-1	$p_{48}$	tlen
$p_{23}$	kompleks selektyny E i liganda dla tej selektyny (selektyna E – ESL1)	$p_{49}$	miażdżycy
$p_{24}$	proces zapalny	$p_{50}$	zwiększone stężenie ADMA
$p_{25}$	przylegające leukocyty do śródbłonka naczyniowego		

**Tabela 50.** Charakterystyka tranzycji modelu dysfunkcji śródbłonka naczyniowego w miażdżycy przedstawionego za pomocą sieci Petriego na rycinie 64

Tranzycja	Nazwa tranzycji	Tranzycja	Nazwa tranzycji
$t_0$	synteza NO pod wpływem eNOS	$t_{26}$	przechodzenie leukocytów przez barierę śródbłonka
$t_1$	małe ilości NO dyfundują z komórek śródbłonka do komórek mięśni gładkich naczyń	$t_{27}$	ekspresja PECAM-1 na komórkach śródbłonka, leukocytach i płytkach krwi
$t_2$	zmniejszenie aktywności kinazy białkowej G	$t_{28}$	synteza białek
$t_3$	obniżenie czynnego wychwyty jonów wapnia z sarkoplazmy	$t_{29}$	proteoliza
$t_4$	aktywacja syntezy iNOS	$t_{30}$	synteza eNOS
$t_5$	nasilenie zjawiska stresu oksydacyjnego, zwiększone powstawanie ROS	$t_{31}$	procesy nasilające syntezę ADMA
$t_6$	powstawanie NADPH	$t_{32}$	modyfikacja cząsteczek LDL pod wpływem ROS

cd. tabeli 50.

Tranzycja	Nazwa tranzycji	Tranzycja	Nazwa tranzycji
t <sub>7</sub>	pobudzenie makrofagów	t <sub>33</sub>	obniżenie stężenia NO pod wpływem ROS
t <sub>8</sub>	dysfunkcja/aktywacja śródbłonna	t <sub>34</sub>	reakcje/procesy w wyniku których powstaje tlen
t <sub>9</sub>	wzrost stężenia wapnia w cytozolu komórek śródbłonna	t <sub>35</sub>	synteza cholesterolu LDL
t <sub>10</sub>	procesy związane z metabolizmem homocysteiny prowadzące do powstania tetrahydrobiopteryny	t <sub>36</sub>	reakcje prowadzące do powstania FAD
t <sub>11</sub>	wpływ dużych naprężeń stycznych na ściany naczyń krwionośnych	t <sub>37</sub>	reakcje prowadzące do powstania FMN
t <sub>12</sub>	pobudzenie syntezy agonistów naczynio-rozszerzających	t <sub>38</sub>	pobudzenie VCAM-1 pod wpływem ox-LDL
t <sub>13</sub>	wiązanie kalmoduliny z kaweoliną	t <sub>39</sub>	przyleganie płytek do śródbłonna naczyniowego
t <sub>14</sub>	rozpad kompleksu kalmodulina-kaweolina 1	t <sub>40</sub>	hamowanie NOS przez ADMA i w konsekwencji obniżenie stężenia NO
t <sub>15</sub>	nitrozyłacja i nitrowanie białek	t <sub>41</sub>	synteza białek wewnątrzkomórkowych (m.in. włókien aktyny, czynniki sygnalizacyjne: filamina, paksylina i inne)
t <sub>16</sub>	wykorzystanie kaweoliny	t <sub>42</sub>	wydzielanie różnych czynników przez płytki przylegające do śródbłonna naczyniowego
t <sub>17</sub>	skurcz mięśni gładkich naczyń pod wpływem zmniejszonych stężeń NO	t <sub>43</sub>	aktywacja płytek krwi
t <sub>18</sub>	kotwiczenie leukocytów do błony wewnętrznej naczyń pod wpływem VCAM-1	t <sub>44</sub>	odstąpienie kolagenu w uszkodzonym śródbłonnku
t <sub>19</sub>	wiązanie selektyny E ze swoim ligandem (ESL-1) na powierzchni leukocytów	t <sub>45</sub>	odstąpienie czynnika vWF w uszkodzonym śródbłonnku
t <sub>20</sub>	wpływ procesu zapalnego	t <sub>46</sub>	udział komórek śródbłonna
t <sub>21</sub>	kotwiczenie leukocytów do błony wewnętrznej naczyń pod wpływem ICAM-1	t <sub>47</sub>	synteza NO pod wpływem iNOS
t <sub>22</sub>	wiązanie selektyny P ze swoim ligandem (PSGL-1) na powierzchni leukocytów	t <sub>48</sub>	synteza cytokin
t <sub>23</sub>	przyleganie leukocytów do śródbłonna poprzedzone toczeniem się leukocytów	t <sub>49</sub>	progresja miażdżycy
t <sub>24</sub>	skurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych wywołany endoteliną i tromboksanem	t <sub>50</sub>	synteza i następnie wydzielanie substancji biologicznie czynnych przez pobudzony śródbłonek
t <sub>25</sub>	transmigracja leukocytów poprzedzona ich przyleganiem do komórek śródbłonna	t <sub>51</sub>	reakcja, w której L-cytrulina ulega przemianie do L-argininy poprzez przyłączenie atomu azotu.



**Rycina 64.** Model prezentujący wybrane zagadnienia związane z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego w aspekcie powstawania i rozwoju miażdżycy [76].

#### 6.4.2.2. Opis modelu dysfunkcji śródbłonna naczyniowego.

Model oparty na sieciach Petriego przedstawiony na rycinie 64. został zbudowany w taki sposób, aby zaprezentować wybrane zjawiska biochemiczne zachodzące w trakcie dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, które są kluczowe dla procesu powstawania i rozwoju miażdżycy. Stały dopływ tokenów w ważnych dla sieci miejscach warunkuje, częściowo już wcześniej opisanych, szesnaście tranzycji wejściowych, tj.  $t_6$  (powstanie NADPH),  $t_{10}$  (procesy związane z metabolizmem homocysteiny prowadzące do powstania tetrahydrobiopteryny),  $t_{11}$  (wpływ dużych naprężeń stycznych na ściany naczyń krwionośnych),  $t_{12}$  (pobudzenie syntezy agonistów naczynio-rozszerzających),  $t_{13}$  (wiązanie kalmoduliny z kaweoliną),  $t_{20}$  (wpływ procesu zapalnego),  $t_{27}$  (ekspresja PECAM-1 na komórkach śródbłonna, leukocytach i płytkach krwi),  $t_{28}$  (synteza białek),  $t_{34}$  (reakcje/procesy w wyniku których w organizmie powstaje tlen),  $t_{35}$  (synteza cholesterolu LDL),  $t_{36}$  (reakcje prowadzące do powstania FAD),  $t_{37}$  (reakcje prowadzące do powstania FMN),  $t_{41}$  (synteza białek wewnątrzkomórkowych (m.in. włókien aktywnych, czynniki sygnalizacyjne: filamina, paksylina i inne)),  $t_{44}$  (odślonięcie kolagenu w uszkodzonym śródbłonku),  $t_{45}$  (odślonięcie czynnika vWF w uszkodzonym śródbłonku),  $t_{46}$  (udział komórek śródbłonna). Ponadto w modelu znajdują się trzy tranzycje wyjściowe, do których dąży modelowany proces, tj.  $t_{23}$  (przyleganie leukocytów

do śródbłonka poprzedzone toczeniem się leukocytów),  $t_{16}$  (wykorzystanie kaewoliny) oraz najważniejszy z punktu modelowanego zjawiska proces progresji miażdżycy,  $t_{49}$ .

Aby proces został uruchomiony musi być obecny token w miejscu  $p_{32}$  (L-cytrulina). Z kolei gdy on się zużyje (token zasili proces  $t_{51}$  (reakcja, w której L-cytrulina ulega przemianie do L-argininy poprzez przyłączenie atomu azotu), to napływ kolejnych tokenów będzie konsekwencją zachodzenia procesów  $t_0$  (synteza NO pod wpływem eNOS),  $t_{34}$  (reakcje/procesy w wyniku których powstaje tlen),  $t_{47}$  (synteza NO pod wpływem iNOS). Z kolei aby została w sieci odpalona tranzycja  $t_0$  (synteza NO pod wpływem eNOS), musi zostać uruchomionych aż osiem tranzycji, spośród których sześć ( $t_6$ ,  $t_{10}$ ,  $t_{34}$ ,  $t_{36}$ ,  $t_{37}$ ,  $t_{46}$ ) jest jednocześnie tranzycjami wejściowymi, czyli nie limitującymi zachodzenia procesów, bo tokeny przez nie generowane są zawsze. Napływ tokenów do miejsca  $p_{32}$  będą modułować dwie tranzycje, tj.  $t_{30}$  (synteza eNOS) i  $t_{47}$  (synteza NO pod wpływem iNOS). Tranzycja  $t_{30}$  właściwie też zachowuje się jak tranzycja wejściowa, bo choć nią nie jest to ma bardzo dużą szansę na odpalenie (aktywację), co gwarantuje jej połączenie z dwoma wejściowymi tranzycjami ( $t_{12}$  i  $t_{13}$ ), stąd kluczowa pozostaje jedynie jedna tranzycja, tj.  $t_{47}$ . Aby możliwy był przepływ przez nią tokenów, zgodnie z zasadą aktywacji tranzycji, znaczniki muszą pojawić się w miejscach  $p_7$  (L-arginina),  $p_{47}$  (iNOS) i  $p_{48}$  (tlen). Tlen będzie istniał w sieci stale bo jest połączony z wejściową tranzycją  $t_{34}$ . Stąd miejsca  $p_7$  i  $p_{47}$  będą tu kluczowymi modulatorami. Napływ do  $p_7$  będzie możliwy wtedy, gdy w sieci będzie odbywała się synteza cytokin ( $t_{48}$ ) zachodząca pod wpływem  $t_5$  (nasilenie zjawiska stresu oksydacyjnego, zwiększone powstawanie ROS) i  $t_{20}$  (wpływ procesu zapalnego).

Aby w modelu pojawiła się dysfunkcja śródbłonka, czyli została odpalona tranzycja  $t_8$  tokeny (znaczniki), które są dynamicznymi składnikami sieci muszą pojawić się w czterech miejscach wejściowych dla tej tranzycji, tj. w miejscu  $p_{46}$  (który odpowiada komórkom śródbłonka naczyniowego w sieci), miejscu  $p_{10}$  (duże naprężenia styczne oddziałujące na ściany naczyń krwionośnych) oraz dwóch miejscach logicznych, tj.  $p_{18}$  (cytokiny) i  $p_{37}$  (zmodyfikowana cząsteczka LDL (ox-LDL)). Aktywacja (dysfunkcja) śródbłonka powoduje przepływ znacznika do miejsca  $p_{15}$  (odpowiednik pobudzonych komórek śródbłonka naczyniowego), co z kolei dostarcza tokenów dla procesu  $t_{50}$  (synteza i następnie wydzielanie substancji biologicznie czynnych przez pobudzony śródbłonek). Proces ten jest kluczowy dla dynamiki całej sieci, stąd bowiem przepływają tokeny do siedmiu miejsc, tj.  $p_{17}$  (ROS),  $p_{19}$  (ICAM-1),  $p_{20}$  (selektyny E),  $p_{21}$  (selektyny P),  $p_{22}$  (VCAM-1),  $p_{27}$  (endotelina 1 (ET-1)),  $p_{28}$  (synteza białka aktywującego płytki (PAF)), które są dostawcami tokenów niezbędnymi dla podtrzymania obecności miażdżycy w sieci ( $p_{49}$ ) i jej progresji ( $t_{49}$ ). Aby jednak nastąpiło zjawisko progresji miażdżycy w sieci nie wystarczy dynamiczny element obecny w miejscu  $p_{49}$ , muszą być uruchomione procesy, które dostarczą tokenów do miejsc  $p_{17}$  (ROS),  $p_{18}$  (cytokiny),  $p_{33}$  (LDL-cholesterol) i  $p_{37}$  (zmodyfikowana cząsteczka

LDL (ox-LDL)). Procesy, które dostarczą tokenów do wspomnianych miejsc to m.in.  $t_{20}$  (wpływ procesu zapalnego) i  $t_5$  (nasilenie zjawiska stresu oksydacyjnego, zwiększone powstawanie ROS). Nasilenie procesów zapalnych i zjawiska stresu oksydacyjnego w sieci doprowadzi do aktywacji syntezy iNOS ( $t_4$ ), dzięki której zwiększy się zdecydowanie ilość tlenu azotu w sieci ( $p_{34}$ ), który do tej pory dostarczany był jedynie dzięki konstytutywnej aktywności eNOS (proces  $t_0$ ). Zwiększona dostępność NO w sieci doprowadzą do sytuacji, że gdy tylko pojawi się token w miejscu ROS, czyli gdy zaistnieje zjawisko stresu oksydacyjnego, powstanie nadtlenoazotyn ( $p_{14}$ ), który z kolei uruchomi tranzycję  $t_{15}$  (nitrozyłacja i nitrowanie białek). Doprowadzi to do zmniejszenia stężenia NO ( $p_0$ ), które dodatkowo będzie zmniejszane gdy tokeny pojawią się w  $t_{40}$  (hamowanie NOS przez ADMA i w konsekwencji obniżenie stężenia NO). Zmniejszona ilość NO doprowadzi do odpalenia  $t_1$  (małe ilości NO dyfundują z komórek śródbłonna do komórek mięśni gładkich naczyń), a następnie  $t_2$  (zmniejszenie aktywności kinazy białkowej G) i  $t_3$  (obniżenie czynnego wychwytu jonów wapnia z sarkoplazmy), co w końcu spowoduje napływ tokenów do miejsca  $t_{17}$  (skurcz mięśni gładkich naczyń pod wpływem zmniejszonych stężeń NO) i w konsekwencji pojawi się miażdżycy w sieci. Do powstania miażdżycy doprowadzą także procesy  $t_{25}$  (transmigracja leukocytów poprzedzona ich przyleganiem do komórek śródbłonna),  $t_{26}$  (przechodzenie leukocytów przez barierę śródbłonna) i  $t_{43}$  (aktywacja płytek krwi), których uruchomienie zostało zapoczątkowane opisanym już procesem  $t_{50}$  (synteza i następnie wydzielanie substancji biologicznie czynnych przez pobudzony śródbłonek).

#### 6.4.2.3. Analiza modelu dysfunkcji śródbłonna naczyniowego

##### **Analiza strukturalna**

Zaprezentowany model jest dyskretną siecią Petriego z miarami na wszystkich lukach równymi 1. Podobnie jak w poprzednich modelach, nie zawiera on informacji na temat szybkości zachodzenia poszczególnych procesów, ani na temat stężeń/ aktywności cząsteczek biorących w nim udział. Dlatego na podstawie analizy zachowania tego modelu można jedynie badać pewne zależności jakościowe. Sieć jest zwyczajna, jednorodna, czysta, nie jest zachowawcza, nie jest ograniczona (zawiera tranzycje wejściowe i wyjściowe), ma 8 minimalnych t-inwariantów ( $x_1-x_8$ ) i jest przez nie pokryta, nie zawiera natomiast p-minimalnych niezmienników i nie jest przez nie pokryta.

Sieć zawiera 9 zbiorów MCT, których szczegółowa charakterystyka została przedstawiona w tabeli 51.

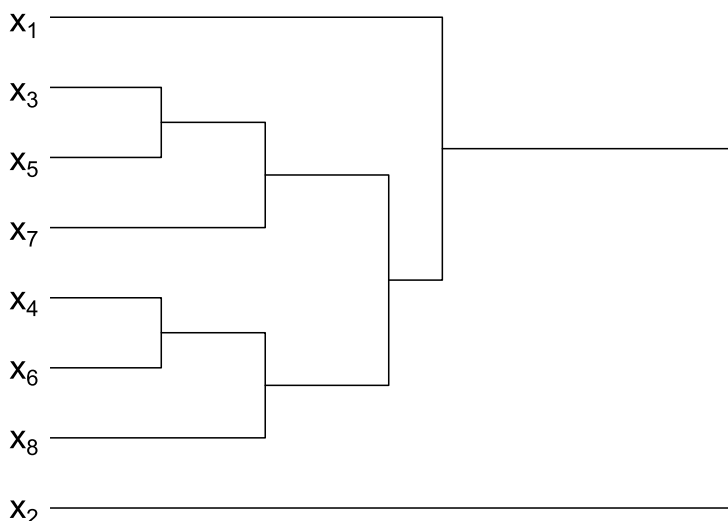
T-niezmienniki zostały pogrupowane w t-klastry przy pomocy algorytmu UPGMA, co zostało zaprezentowane na rycinie 65. Z kolei charakterystyka t-niezmienników została pokazana w tabeli 52.

t-niezmienniki są przedstawione jako suma zbiorów MCT i pojedynczych tranzycji, które się w tych zbiorach nie znalazły.



**Tabela 51.** Charakterystyka zbiorów MCT sieci przedstawionej na rysunku

Zbiory MCT	Tranzycje	Charakterystyka
$m_1$	$t_8, t_{19}, t_{22}, t_{23}, t_{24}, t_{26}, t_{39}, t_{42}, t_{43}, t_{44}, t_{45}$	procesy w sposób bezpośredni związane z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego
$m_2$	$t_0, t_6, t_{10}, t_{14}, t_{16}, t_{30}, t_{36}, t_{37}$	procesy zaangażowane w syntezę NO
$m_3$	$t_5, t_7, t_{20}, t_{32}, t_{35}, t_{48}, t_{49}$	procesy nasilające tworzenie blaszki miażdżycowej (proces zapalny i stres oksydacyjny)
$m_4$	$t_1, t_2, t_3, t_{17}, t_{34}, t_{51}$	procesy prowadzące do skurczu mięśni gładkich naczyń krwionośnych (zmniejszenie światła naczynia)
$m_5$	$t_{18}, t_{21}, t_{25}, t_{27}, t_{41}$	procesy wpływające na zachowanie leukocytów w procesie miażdżycy
$m_6$	$t_{28}, t_{29}, t_{31}, t_{40}$	wpływ ADMA na powstawanie NO
$m_7$	$t_4, t_{47}$	procesy wpływające na iNOS
$m_8$	$t_9, t_{12}$	procesy modulujące wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia
$m_9$	$t_{15}, t_{33}$	nitrozyllacja



**Rycina 65.** Dendrogram: t-inwarianty modelu dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w miażdżycy pogrupowane w klastry.

**Tabela 52.** Charakterystyka t-niezmienników sieci przedstawionej na rycinie 64

t-niezmienniki	Zbiory MCT	Pojedyncze tranzycje, które nie znalazły się w zbiorach MCT
$x_1$	$m_3, m_5$	$t_{38}$
$x_2$	$m_1, m_3, m_5$	$t_{11}, t_{46}$
$x_3$	$m_2, m_3, m_4, m_9$	$t_{11}, t_{13}, t_{46}$
$x_4$	$m_2, m_3, m_4, m_6$	$t_{11}, t_{13}, t_{46}$
$x_5$	$m_2, m_3, m_4, m_8, m_9$	$t_{11}, t_{46}$
$x_6$	$m_2, m_3, m_4, m_6, m_8$	$t_{11}, t_{46}$
$x_7$	$m_3, m_4, m_7, m_9$	$t_{11}$
$x_8$	$m_3, m_4, m_6, m_7$	$t_{11}$

Na podstawie uzyskanych wyników oraz analizy zachowania sieci można założyć, że wszystkie t-niezienniki zawierają w swym składzie zbiór  $m_3$  (procesy nasilające tworzenie blaszki miażdżycowej – proces zapalny i stres oksydacyjny). Procesy te w sposób bezpośredni wpływają na wszystkie zjawiska, jakie mają miejsce w sieci.

Największe różnice w odległości na dendrogramie dają się zauważyć pomiędzy  $x_2$  i pozostałymi t-nieziennikami. Nieziennik ten jako jedyny ma w swej strukturze zbiór  $m_1$  (procesy w sposób bezpośredni związane z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego). Również oddalony od pozostałych inwariantów jest  $x_1$ , który obok zbioru  $m_3$  (procesy nasilające tworzenie blaszki miażdżycowej – proces zapalny i stres oksydacyjny) i  $m_5$  (procesy wpływające na zachowanie leukocytów w procesie miażdżycy) zawiera, jako jedyny z minimalnych t-inwariantów, tranzycję  $t_{38}$  (pobudzenie VCAM-1 pod wpływem ox-LDL). Widać na tej podstawie, że to pobudzenie jest niezwykle ważne dla procesów zapalnych, oksydacyjnych i ma wpływ na zachowanie leukocytów w miażdżycy.

Ponadto niezienniki  $x_3$  i  $x_5$  oraz  $x_4$  i  $x_6$  są ze sobą silnie strukturalnie związane, co można zauważyć na rycinie 65. i tylko nieznacznie różnią się między sobą. Nieziennik  $x_5$  zawiera zbiór  $m_8$  (procesy modulujące wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia) którego nie ma nieziennik  $x_3$ , ale z drugiej strony nie zawiera pojedynczej tranzycji  $t_{46}$  (udział komórek śródbłonna), którą posiada nieziennik  $x_3$ . Natomiast nieziennik  $x_6$  ma dodatkowy zbiór  $m_8$ , którego nie ma nieziennik  $x_4$ , ale nie zawiera pojedynczej tranzycji  $t_{13}$  (wiązanie kalmoduliny z kaweoliną).

W nieziennikach  $x_8$ ,  $x_7$  współwystępują obok siebie zbiory  $m_4$  (procesy prowadzące do skurczu mięśni gładkich naczyń krwionośnych) i  $m_6$  (wpływ ADMA na powstawanie NO), co jest zjawiskiem oczywistym, z drugiej strony pozwala założyć, że model został poprawnie zbudowany, a modelowane w nim zjawisko odzwierciedla charakter i złożoność procesu, jaki występuje w organizmie człowieka.

## 7. Dyskusja

Główną ideą pracy było ukazanie złożoności procesu, jakim jest miażdżyca, ze szczególnym naciskiem położonym na ocenę zaburzeń obserwowanych wśród pacjentów z narastającym upośledzeniem funkcji nerek.

W celu zrozumienia odmienności miażdżycy towarzyszącej PChN, w rozprawie zaprezentowano wybrane aktualne koncepcje wyjaśniające patomechanizmy leżące u podłoża tzw. „tradycyjnej” miażdżycy, której przedstawicielami w rozprawie byli pacjenci z grupy CVD, tj. chorzy z chorobą wieńcową, nadciśnieniem tętniczym i przynajmniej jednym ostrym incydentem wieńcowym w wywiadzie. O trudnościach związanych z podjętym zagadnieniem świadczy fakt, iż pomimo trwających ponad 200 lat badań i wykorzystania najnowocześniejszych technik badawczych, nadal naukowcy mają wiele wątpliwości, czasem wręcz kluczowych np. nie ma jednomyślności wśród badaczy, co do kolejności zachodzenia poszczególnych zjawisk leżących u podłoża miażdżycy. W ogólności istnieje zgodność w kwestii elementów składowych, które muszą zaistnieć, aby do miażdżycy doszło, wśród których są proces zapalny, stres oksydacyjny, zaburzenia immunologiczne i zaburzenia lipidowe [14]. Czy miażdżyca da się uniknąć, czy jest ona nierozłącznie związana z, konserwatywnym i niedostosowanym do współczesnych warunków środowiskowych, genomem współczesnego człowieka? Czy może jak proponuje Grundtman jest ona pewną konsekwencją naturalnej ludzkiej odporności anty-HSP? A może winą należałoby obarczyć rozpowszechnione w ludzkiej populacji patogeny, takie jak np. *Chlamydia pneumoniae* czy *Escherichia coli*? Aby móc w pełni rozeznaczyć się w tej wielowątkowości należy spojrzeć na zjawisko miażdżycy w sposób bardziej całościowy. Jest to zapewne trudniejsze aniżeli badanie poszczególnych jej etapów. Ogarnąć złożoność procesu i jednocześnie nie zatracić informacji o jego elementach składowych. Takie podejście proponują biologia i medycyna systemowa, dla których człowiek to „system”, zespół molekuł, grup cząsteczek, tkanek oraz narządów wzajemnie ze sobą powiązanych i na siebie oddziałujących. W tym kontekście nie da się „wyjąć” jednej molekuly i jej odrębnie analizować, bo utraci się wtedy cenne informacje na temat uwarunkowań, którym ona podlega. Można to zrobić jedynie pod warunkiem, że potraktujemy taką analizę jako źródło informacji. Biologia i medycyna systemowa, proponując takie kompleksowe podejście do analizowanych zjawisk, wymagają jednocześnie dostarczania coraz bardziej precyzyjnych danych, aby jak najdokładniej zamodelować dany proces. Albowiem, im więcej danych zostanie uwzględnionych w modelu, tym jego działanie w wierniejszy sposób będzie odzwierciedlało rzeczywistość, a poczynione na tej podstawie

analizy będą bardziej wartościowe. Może się jednak okazać, że takie podejście w pewnym sensie przekracza możliwości ludzkiego umysłu. Po prostu możemy nie być w stanie tego wszystkiego ogarnąć. Biologia/medycyna systemowa daje nam do celów analitycznych pewne narzędzia, jednym z nich są wykorzystane w rozprawie sieci Petriego, w których kluczowym elementem analiz jest etap budowy sieci, wymagający relatywnie dużej wiedzy w danej dziedzinie.

W rozprawie skupiono się przede wszystkim na analizie molekularnego podłoża miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek, z uwzględnieniem zmian jakie zachodzą w zależności od stopnia upośledzenia funkcji nerek. Przesłanki do podjęcia tego tematu wynikały z faktu, iż pomimo wielkiego postępu, jaki dokonał się w dziedzinie badań nad powstawaniem miażdżycy (teoria lipidowa, teoria oksydacyjna, teoria uszkodzenia śródbłonna, zapalna i ujednoczona teoria powstawania miażdżycy), nadal przyczyna nasilenia miażdżycy u chorych z PChN pozostaje nie w pełni wyjaśniona. A jak wiadomo PChN, niezależnie od etiologii, charakteryzuje się przyspieszonym rozwojem miażdżycy oraz zaawansowaną przebudową naczyń i mięśnia sercowego. Zagadnienie to jest tym bardziej istotne, że pogłębienie wiedzy w jego zakresie może przyczynić się do poprawy rokowania wśród chorych z PChN, u których śmiertelność z powodów sercowo-naczyniowych przewyższa 30–300-krotnie śmiertelność w ogólnej populacji [66]. Trudności podjętego tematu wynikają z konieczności uwzględnienia złożoności miażdżycy i złożoności przewlekłej choroby nerek, w przebiegu której dochodzi do narastania zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej i kwasowo-zasadowej, zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej, zaburzenia metabolizmu węglowodanów, niedokrwistość, zaburzeń lipidowych oraz przewlekłych procesów zapalnych, które szczególnie zaczynają być widoczne już w 3. stadium PChN. Czy w obliczu tak wielu dodatkowych czynników miażdżycy w PChN jest nadal tą samą tradycyjną miażdżycą, czy może należałoby używać terminu „miażdżycy związana z PChN” (ang. *chronic kidney disease-related atherosclerosis*), jak zaproponowano w [188], aby podkreślić odmiennosc tego procesu? Badacze są zgodni co do tego, że te wspomniane procesy różnią się między sobą. Odmiennosci wynikają raczej ze zmian w strukturze blaszki miażdżycowej, a nie różnic w zakresie objętości lub ilości blaszek w naczyniach [65]. Zauważalne różnice dotyczą również manifestacji klinicznej. Miażdżycy w PChN występuje 30-krotnie częściej, a śmiertelność wywołana jej powikłaniami jest kilkadziesiąt razy większa wśród chorych z PChN w porównaniu z populacją zdrowych osób.

Aby dowiedzieć się więcej na temat podłoża molekularnego procesów, przyczyniających się do powstawania miażdżycy u chorych z PChN, w ramach projektu, który był podstawą napisania tej rozprawy, zrealizowano cztery następujące zadania badawcze:

- a) ocena stanu zapalnego i poziomu stresu oksydacyjnego w grupie chorych z przewlekłą chorobą nerek;

- b) identyfikacja białek odgrywających istotną rolę w procesie powstawania miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek i porównanie otrzymanych wyników z tymi uzyskanymi od chorych z niestabilną chorobą wieńcową i/lub zawałem serca w wywiadzie, lecz bez klinicznych i laboratoryjnych cech upośledzenia funkcji nerek oraz od zdrowych ochotników – w badaniach wstępnych za- uważano bowiem istotne zmiany w proteomie chorych;
- c) analiza modyfikacji posttranslacyjnych zachodzących pod wpływem miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek oraz w grupie chorych z niestabilną chorobą wieńcową i/lub zawałem serca w wywiadzie;
- d) stworzenie modeli stresu oksydacyjnego i dysfunkcji śródbłonna naczyniowego przy użyciu sieci Petriego.

### Omówienie wyników zadania badawczego pt. *Analiza stanu zapalnego i poziomu stresu oksydacyjnego w grupie chorych z przewlekłą chorobą nerek*

#### *Profil lipidowy*

Zanim zostanie przedstawione omówienie wyników tego zadania, przyjrzymy się miażdżycy wśród badanych osób w kontekście obserwowanych zaburzeń profilu lipidowego i zmian grubości blaszki miażdżycowej.

Na podstawie wyników uzyskanych w badaniu widać wyraźnie, że chorzy z PChN różnili się profilem lipidowym między sobą oraz w porównaniu do grup HV i CVD. Pacjenci grup CKD1–2 i CKD3–4 cechowali się wyższymi stężeniami LDL-cholesterolu w surowicy krwi w porównaniu z chorymi hemodializowanymi i nie różnili się pod tym względem w stosunku do chorych grupy CVD, czyli tych z tzw. tradycyjnymi czynnikami ryzyka. Jednocześnie charakteryzowali się nieco podwyższonymi wartościami cholesterolu całkowitego (powyżej wartości rekomendowanych) i TAG oraz zdecydowanie podwyższonymi stężeniami LDL-cholesterolu. Przy czym należy zaznaczyć, że różnice w zakresie wspomnianych parametrów, poza stężeniem LDL-cholesterolu, były w grupach CVD, CKD1–2 oraz CKD3–4 nieistotne statystycznie. Jeśli chodzi o stężenie cholesterolu frakcji HDL, to odnotowano we wszystkich grupach średnie stężenie tej frakcji cholesterolu przekraczające wartość 40 mg/dL, co jest wielkością pożądaną. Zdrowi, osoby z grup CKD1–2 i CKD3–4 wykazywali szczególnie wysokie stężenia cholesterolu frakcji HDL w surowicy krwi (średnie stężenia powyżej 50 mg/dL). Z kolei najniższe stężenia cholesterolu frakcji HDL mieli chorzy z grup CVD i CKD5B. Zaburzenia lipidowe obserwowane w grupach CKD1–2 i CKD3–4 różniły się nieco od tych obserwowanych w badaniu *Cardiovascular Heart Study* [273], gdzie stężenie LDL-cholesterolu w grupie chorych z PChN o umiarkowanym stopniu zaawansowania choroby nerek nie różniło się istotnie w porównaniu ze stężeniami obserwowanymi wśród osób z prawidłową funkcją nerek (w obecnym badaniu to był parametr, który w grupach o umiarkowanym nasileniu choroby, był najbar-

dziej podwyższony). Ponadto w tym wspomnianym badaniu chorzy wykazywali istotnie wyższe stężenia TAG i niższe HDL-cholesterolu w porównaniu z grupą bez upośledzonej funkcji nerek (w obecnym badaniu stężenie TAG było porównywalne, a stężenie cholesterolu HDL niższe od obserwowanego w grupie HV, lecz w granicach wartości prawidłowych). Uzyskane w ramach obecnego projektu wyniki były zbliżone do tych obserwowanych w badaniu *ARIC (The Atherosclerosis Risk In Communities)*, gdzie wśród chorych będących w stadium 3–4 PChN, zauważono istotnie wyższe stężenie całkowitego cholesterolu i TAG oraz istotnie niższe stężenie HDL-cholesterolu w stosunku do wyników obserwowanych wśród osób bez PChN [136, 214]. Jeśli chodzi o interpretację podwyższonego stężenia LDL-cholesterolu obserwowanego w obecnym badaniu wśród chorych w stadiach 1–4 PChN, to prawdopodobnie te podwyższone stężenia wynikały z zaburzeń lipidowych, które musiały się pojawić zanim osoby zaczęły chorować na PChN. Podwyższone stężenie cholesterolu LDL nie jest bowiem typowe dla dyslipidemii obserwowanej w PChN, której podłoże jest szczególnie złożone. Vaziri dla podkreślenia odrębności zmian obserwowanych wśród pacjentów z najbardziej zaawansowaną postacią PChN używa określenia „uremic dyslipidemia” [307]. Jak zaznaczono, dyslipidemia w niewydolności nerek ma specyficzny charakter, niezależny od wyjściowej przyczyny uszkodzenia nerek. W PChN dochodzi do upośledzonego metabolizmu lipoprotein spowodowanego zmniejszeniem aktywności enzymów, takich jak lipaza lipoproteinowa, acylotransferaza lecytyna: cholesterol, acetylotransferaza acylo-CoA oraz wątrobowa lipazy triglicerydowa [236, 237]. Obecnie spadek aktywności tych enzymów tłumaczy się obecnością krążących w ustroju substancji o właściwościach inhibitorów dla tych enzymów, które nie są wystarczająco usuwane z organizmu w sytuacji upośledzonej funkcji nerek. W konsekwencji dochodzi do zmniejszonego rozkładu triglicerydów i hipertriglicydemii. Dodatkowo zmiany aktywności lipazy lipoproteinowej powodują, że przy niezmięnionej syntezie wątrobowej VLDL dochodzi do zaburzenia na etapie przekształcania VLDL w IDL, a te z kolei z powodu zahamowania wątrobowej lipazy nie przechodzą dalej w lipoproteiny LDL. Dodatkowo w mocznicy obserwuje się zwiększenie stężenia lipoproteiny a, cechującej się wysoką metaboliczną aktywnością, która obok nadmiaru TAG sprzyja przyspieszonemu powstawaniu zmian miażdżycowych w naczyniach. Ponadto, w obliczu zaburzeń receptorów wątrobowych dla lipoprotein, zauważalne jest przesunięcie równowagi na korzyść LDL przeładowanych TAG, tj. małych gęstych LDL, co obok wcześniej wspomnianych zaburzeń powoduje przynajmniej 3-krotnie szybszy rozwój blaszki miażdżycowej. Niektórzy badacze podkreślają, że mechanizmy prowadzące do dyslipidemii mogą być bardziej złożone i wskazują m.in. na rolę insulinooporności oraz zwiększonej lipolizy. Wydaje się, że zmiany miażdżycowe w PChN są raczej wynikiem zaburzeń składu lipidów niż następstwem zwiększenia ich stężeń.

W obecnym badaniu zaburzenia lipidowe nie zawsze były tak charakterystyczne, np. pacjenci hemodializowani charakteryzowali się zdecydowanie ob-

nizonym stężeniem TAG i stężeniem całkowitego cholesterolu w surowicy krwi, w porównaniu z pozostałymi badanymi. Najniższe stężenie całkowitego cholesterolu wykazywali chorzy z grupy CKD5B, którzy jednocześnie charakteryzowali się najniższymi stężeniami TAG w surowicy krwi. Co ciekawe, zaburzeniom tym towarzyszył najniższy średni wskaźnik BMI, zbliżony do tego obserwowanego w grupie zdrowych, lecz niższy w stosunku do chorych z grup CKD1–4 i CVD oraz najgrubsza blaszka miażdżycowa oceniona na podstawie wielkości IMT. Wygląda na to, że nie można wszystkich zgonów sercowo-naczyniowych w grupie chorych hemodializowanych tłumaczyć jedynie w sposób klasyczny, tj. obecnością tradycyjnych czynników ryzyka, wśród których ważnymi czynnikami są zaburzenia gospodarki lipidowej, z wysokimi stężeniami cholesterolu LDL na czele. U badanych chorych hemodializowanych ten czynnik nie występował, co wcale oczywiście nie wykluczało w ich przypadku możliwości powstania zmian miażdżycowych, które paradoksalnie były w tej grupie najbardziej nasilone spośród wszystkich badanych grup (najwyższy wskaźnik IMT). Skąd ten paradoks? Wspomniano o tym na początku rozprawy. Wśród pacjentów hemodializowanych obserwuje się zjawisko „odwróconej epidemiologii chorób sercowo-naczyniowych”, będące najczęściej wyrazem ich niedożywienia. Pośrednie informacje o niedożywieniu można uzyskać na podstawie analizy wielkości wskaźnika BMI. Tak jak już wspomniano, chorzy dializowani charakteryzowali się, podobnie jak osoby zdrowe, prawidłowymi, lecz zarazem najniższymi wartościami wskaźnika BMI wśród wszystkich badanych chorych. Gdy przyjrzymy się obu podgrupom CKD5, można zauważyć, że najniższe, lecz ciągle prawidłowe wartości wskaźników BMI wykazywali chorzy dializowani, którzy przeżyli 12-miesięczny okres obserwacji. Z kolei wyniki tych pacjentów dializowanych, którzy zmarli w ciągu 12-miesięcznej obserwacji były u części w granicach wartości prawidłowych, lecz średnia dla całej podgrupy oscylowała wokół wartości BMI świadczących o lekkiej nadwadze. Dodatkowo nie zaobserwowano różnic pomiędzy badanymi osobami w zakresie stężenia albumin w surowicy, a jak wiadomo, istnieje bezpośredni związek pomiędzy stężeniem albumin a niedożywieniem białkowo-kalorycznym. Nie ma więc podstaw do stwierdzenia, że chorzy dializowani zakwalifikowani do obecnego badania, byli niedożywieni, tym bardziej, że obok prawidłowego lub jedynie nieco podwyższonego wskaźnika BMI charakteryzowali się prawidłowym stężeniem albumin w surowicy krwi. Należy tu podkreślić, że część badaczy występowanie otyłości, a nawet nadwagi wśród chorych hemodializowanych uznaje za cechę korzystną i wiążącą się z lepszym rokowaniem. W obecnym badaniu lekka nadwaga wśród hemodializowanych pacjentów wiązała się z gorszym rokowaniem. Trzeba tu jednak zaznaczyć, że mogły mieć na to wpływ małe liczebności grup CKD5A i CKD5B oraz stosunkowo niewielkie różnice w zakresie wartości wskaźnika BMI, które oscylowały, jak już wspomniano, wokół górnej granicy normy (CKD5A) lub niewielkiej nadwagi (CKD5B). Z drugiej strony, jeśli te wartości wskaźnika BMI odniesiemy do wyników uzyskanych w pozosta-

łych grupach chorych z PChN oraz w grupie CVD, to widać wyraźnie, że chorzy z tych wspomnianych grup charakteryzowali się w większości przypadków zdecydowaną nadwagą lub nawet otyłością. Można więc na tej podstawie stwierdzić, że istnieje tendencja do obniżania się wielkości wskaźnika BMI wśród pacjentów hemodializowanych. Oczywiście idealnie byłoby, gdyby można prześledzić zmieniające się wartości BMI u tych samych osób w zależności od stopnia upośledzenia ich funkcji nerek, wtedy bardziej kategorycznie można by wnioskować o zmniejszaniu się BMI wśród pacjentów leczonych hemodializą.

Z kolei, gdy przyjrzymy się grupom CKD1–2 i CKD3–4 można zauważyć, że pod względem parametrów lipidowych oraz wielkości wskaźnika BMI nie różniły się one istotnie pomiędzy sobą, ani w porównaniu z chorymi z ostrym incydem wieńcowym w wywiadzie, lecz bez choroby nerek (grupa CVD). Oczywiście należy podkreślić, że wszelkie obserwowane zmiany w profilu lipidowym były częściowo korygowane pod wpływem leczenia statynami, a u części chorych także fibratami, przy czym wpływ leków we wszystkich badanych grupach był podobny, ponieważ chorzy byli kwalifikowani do badania w ten sposób, aby nie różnili się istotnie statystycznie sposobem leczenia.

### *Grubość kompleksu intima-media*

Gdy przeanalizujemy wyniki badania IMT we wszystkich grupach, to widać wyraźnie, że można je podzielić na 3 duże grupy: grupa charakteryzująca się najniższą, prawidłową wielkością IMT (średnia 0,4 mm) – osoby z grupy HV, grupa z wartościami IMT oscylującymi w granicach wysokich wartości prawidłowych (średnia 0,8 mm), gdzie znaleźli się pacjenci CKD1–2, CKD3–4 i CKD5A oraz ostatnia grupa, tj. CKD5B (średnia 1,25 mm). Uzyskane wyniki świadczą o pogrubieniu IMT jedynie wśród chorych z grupy CKD5B, natomiast u żadnej z badanych osób, na podstawie uzyskanych wyników IMT, nie można stwierdzić obecności blaszki miażdżycowej, którą zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego i Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego należy rozpoznawać, gdy grubość kompleksu *intima-media* przekracza 1,5 mm [192]. Z drugiej strony, wytyczne wspomnianych Towarzystw pozwalają zdiagnozować obecność blaszki miażdżycowej także wtedy, gdy obserwuje się pogrubienie > 5 mm lub zwiększenie grubości o 50% w stosunku do sąsiedniej ściany tętnicy. Takich analiz w obecnym projekcie nie wykonano, stąd trudno w sposób kategoryczny stwierdzić, że chorzy grupy CKD5B nie mieli blaszki miażdżycowej, tym bardziej, że ich przyczyny zgonu przynajmniej u 7 spośród 11 osób świadczyły o „miażdżycowej” przyczynie zgonu (6 udarów niedokrwiennych, 1 zawał serca i 4 niewydolności krążenia). Należy tu podkreślić, że wyniki, wspomnianego już wcześniej, badania ARIC, które objęło 7289 kobiet i 5552 mężczyzn w wieku 45–64 lat, ujawniły, że wielkość IMT większa od 1 mm może być silnym predyktorem zawału serca lub zgonu w okresie 4–7 lat zarówno wśród mężczyzn, jak i u kobiet [136, 214]. Dodatkowo, wytyczne Euro-



pejskich Towarzystw Nadciśnienia Tętniczego i Kardiologicznego określiły IMT przekraczającą 0,9 mm jako wielkość świadczącą o uszkodzeniu narządowym u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym [142]. W tym kontekście widać wyraźnie, że charakteryzując się najwyższym wskaźnikiem IMT grupa CKD5B miała ryzyko zgonu sercowo-naczyniowego zdecydowanie podwyższone. Grubość IMT wpływała także bezpośrednio na przeżycie chorych hemodializowanych i przy zastosowanym punkcie odcięcia równym 0,9 mm zauważono statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami pacjentów hemodializowanych z  $< i \geq 0,9$  mm IMT. Przeżycie 12-miesięczne w grupie  $\geq 0,9$  mm IMT kształtowało się na poziomie jedynie 28,57%, natomiast w drugiej grupie, tj.  $< 0,9$  mm – na poziomie 100% (wyniki nie zaprezentowane w rozprawie). Co zdecydowało o zwiększonej grubości kompleksu *intima-media* w grupie chorych hemodializowanych? Odpowiedź na to pytanie uzyskamy analizując wyniki regresji wielorakiej dla IMT. W najlepszym modelu opisującym zmienność grubości blaszki miażdżycowej znalazły się następujące parametry: PON-1, neopteryna, HDL-cholesterol, eGFR, PO<sub>4</sub>, iPTH, NT-proBNP, hsCRP, BMI, ADMA, MPO i ferrytyna, przy czym ferrytyna, HDL-cholesterol i neopteryna nie wykazywały cech istotności statystycznej. Wymienione parametry „tłumaczyły” zmienność IMT aż w 99,7%. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że stres oksydacyjny oraz procesy zapalne i zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej były tutaj kluczowymi czynnikami, które w sposób bezpośredni wpłynęły na grubość blaszki miażdżycowej i przynajmniej w części chorych mogły być przyczyną zgonu.

### Proces zapalny

Przyjmuje się, że procesem, który inicjuje rozwój miażdżycy jest nieswoiste uszkodzenie śródbłonna naczyniowego. W PChN jego przyczynę stanowi często subkliniczny, uogólniony proces zapalny, powszechny zwłaszcza w grupie chorych hemodializowanych, a także towarzyszący mu stres oksydacyjny [88, 324]. Aktywacja śródbłonna mogą powodować enzymy uwalniane z pobudzonych leukocytów, prozapalne cytokiny, głównie IL-1, IL-6 i CRP. Taka przewlekająca się aktywacja w konsekwencji prowadzi do jego nieadekwatnej i nieskoordynowanej odpowiedzi na działający bodziec, co m.in. objawia się produkcją ROS, np. OONO<sup>•</sup>. Jeśli bodziec działa długotrwałe lub współistnieje kilka czynników, takich jak przewlekłe zapalenie, nadciśnienie tętnicze, hiperhomocysteinemia, jak ma to miejsce w PChN, dochodzi do uszkodzenia śródbłonna z częściową lub całkowitą utratą jego funkcji, także tych przeciwzkrzepowych i profibrynolitycznych. Wszystko to sprzyja aktywacji, adhezji, i migracji leukocytów w głąb ściany naczyniowej. Dodatkowo, z powodu upośledzonej produkcji śródbłonkowych czynników rozszerzających naczynia, zaczynają przeważać substancje kurczące naczynia. Wszystko to sprzyja miażdżycy. Cechy wzmożonego odczynu zapalnego obserwuje się zarówno w grupie chorych z podwyższonym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych na podłożu zmian miażdżycowych, jak i również

chorych ze schyłkową niewydolnością nerek, leczonych dializami. Niewydolność nerek stymuluje procesy zapalne, nawet gdy ustanie działanie czynnika uszkażdającego miąższ nerkowy. Samo nawet zmniejszenie czynnej masy nerek może indukować wydzielanie prozapalnych cytokin. Dodatkowo wszelkie utajone ogniska infekcji, nawracające zakażenia układu oddechowego lub moczowego, obserwowane wśród chorych z niewydolnością nerek, również mogą stymulować procesy zapalne. Ponadto, w czasie leczenia hemodializą dołącza się do wymienionych czynników wpływ samego dostępu naczyniowego, który może być źródłem infekcji, szczególnie jeśli chory dializowany jest na cewniku znajdującym się w dużych naczyniach lub przy użyciu zespoła naczyniowych utworzonych ze sztucznych tworzyw. Również bioniezgodne błony dializacyjne mogą indukować i podtrzymywać procesy zapalne w organizmie hemodializowanego chorego. Dodatkowo produkty zaawansowanej glikacji białek, których podwyższone stężenie obserwuje się wśród hemodializowanych wpływają na wzrost uwalniania przez makrofagi prozapalnych cytokin.

W obecnym badaniu w celu oceny stanu zapalnego zbadano trzy parametry, tj. stężenie neopteryny, IL-18 oraz hsCRP. Parametry te wybrano nieprzypadkowo, ale aby dodatkowo ocenić aktywację odpowiedzi immunologicznej wśród badanych (neopteryna, IL-18) oraz, aby przeanalizować zmiany najbardziej klasycznego białka ostrej fazy, czyli CRP. Analiza zbiorcza uzyskanych wyników ukazała bardzo wyraźnie, że chorzy grupy CKD5 charakteryzowali się zdecydowanie podwyższonymi stężeniami neopteryny i IL-18. Z kolei różnice w zakresie hsCRP były nieznamienne, z wyjątkiem porównania pomiędzy HV a CKD5B, które ujawniło znamienne podwyższenie stężenia hsCRP w grupie chorych hemodializowanych.

### *Neopteryna*

W przypadku neopteryny, zauważalna była znamienna różnica pomiędzy stężeniami obserwowanymi w grupie CKD5 a resztą badanych, co było zgodne m.in. z wynikami uzyskanymi przez Fuchsa i wsp. [325]. Wiadomo, że neopteryna jest wydalana z organizmu na drodze filtracji kłębuszkowej i poprzez aktywny transport cewkowy [165]. Z jednej strony wysokie stężenia neopteryny, obserwowane wśród hemodializowanych, były zapewne rezultatem kumulacji tego białka na skutek upośledzonej funkcji nerek. W badaniu obserwowano wzrost stężenia neopteryny w miarę narastania upośledzenia funkcji nerek (dodatnia korelacja pomiędzy neopteryną a eGFR). Z drugiej strony należy zauważyć, że te zmiany w stadiach 1–4 PChN były nieznaczne, stąd tak widoczną różnicę w stężeniach neopteryny pomiędzy grupami CKD1–4 a CKD5 nie można jedynie tłumaczyć upośledzoną funkcją nerek. Zapewne dodatkowe czynniki musiały tu mieć wpływ. Aby je wykryć prześledzimy najpierw losy tego białka w ludzkim organizmie.

W czasie trwania odpowiedzi typu komórkowego, aktywowane limfocyty T uwalniają interferon gamma, który z kolei stymuluje ludzkie monocyty i ma-

krofagi do produkcji neopteryny, wolnych rodników ponadtlenkowych oraz TNF- $\alpha$ , który jest uważany za kluczową cytokinę odpowiedzialną za dysfunkcję śródbłónka naczyniowego [162, 325]. IFN- $\gamma$  jest bezpośrednim modulatorem syntezy neopteryny, z kolei TNF- $\alpha$ , interleukiny, oraz lipopolisacharydy i czynniki powodujące fagocytozę w sposób pośredni, poprzez aktywację IFN- $\gamma$ , pobudzają jej wytwarzanie [325]. Neopteryna powstaje z GTP w kilkietapowym procesie, który wydaje się być kluczowy dla jej funkcji. Z GTP najpierw powstaje trifosforan dihydroneopteryny, który następnie jest przekształcany albo w tetrahydrobiopterynę (główny kofaktor dla eNOS), albo w dihydropterynę, która jest w końcowym etapie utleniana do neopteryny. To, który związek powstanie, czy dihydropteryna czy tetrahydropteryna, zależy od aktywności enzymów znajdujących się w monocytach/makrofagach. Zaobserwowano, że aktywność enzymów niezbędnych dla powstania tetrahydrobiopteryny jest w monocytach/makrofagach niska, stąd w większości powstaje dihydrobiopteryna a z niej neopteryna. Gdy w aktywowanych monocytach/makrofagach brakuje tetrahydrobiopteryny, eNOS wykazuje jedynie aktywność oksydazową, tzn., że ROS są generowane w zdecydowanie większym stężeniu niż NO. Procesy te zostały szczegółowo przedstawione w modelu dysfunkcji śródbłónka naczyniowego na rycinie 64. w rozprawie. Zauważono, że w PChN istnieją zaburzenia w metabolizmie pterydiny [75], szczególnie wyraźnie zaznaczone w grupie chorych z mocznicą. Nasilenie procesów zapalnych w tej grupie chorych powoduje stymulację iNOS do syntezy NO. Z drugiej strony należy podkreślić, że aktywowane monocyty/makrofagi zwiększają uwalnianie neopteryny i tym samym dochodzi do względnego zmniejszenia uwalniania tetrahydrobiopteryny. Pojawia się więc rozbieżność pomiędzy aktywnością iNOS i eNOS [75]. U chorych z mocznicą, zaburzeniom w metabolizmie NO sprzyja zmniejszona podaż L-argininy oraz przyspieszone utlenianie tetrahydrobiopteryny. Wracając do samej neopteryny, należy zaznaczyć, że jej podstawowym zadaniem jest modulacja stresu oksydacyjnego w organizmie.

Wieloczynnikowa analiza regresji, której wyniki zostały szczegółowo przedstawione w [75] ukazała, że istotny wpływ na stężenie neopteryny miały następujące parametry: stężenie mocznika, IMT, ciśnienie skurczowe, stężenie ferrytyny, hsCRP, czas leczenia HD, wielkość BMI i eGFR, przy czym wpływ ferrytyny i mocznika był statystycznie istotny. Taki model tłumaczył zmienność neopteryny aż w 95,89%. Co ciekawe nie znalazły się w nim m.in. wzięte pod uwagę na etapie tworzenia idealnego modelu takie zmienne, jak: parametry gospodarki lipidowej, glukoza, albuminy, białko całkowite, występowanie chorób serca oraz zawałów i udarów [75]. Z kolei analiza wieloczynnikowa pokazała, że na stężenie neopteryny mają wpływ trzy parametry, tj. IMT, hsCRP i eGFR [75]. Zaobserwowano także zależności pomiędzy neopteryną a czasem leczenia dializami (korelacja dodatnia) [75], choć nie wszyscy badacze potwierdzili wystąpienie takiej korelacji wśród hemodializowanych.

Podsumowując tę część dyskusji, można zauważyć, że wielkość stężenia neopteryny może świadczyć pośrednio o funkcji nerek, nasileniu immunologicznie indukowanego stresu oksydacyjnego i procesów zapalnych oraz dysfunkcji śródbłonna naczyniowego. Te trzy składowe zapewne miały wpływ na zmiany stężenia neopteryny obserwowane wśród badanych hemodializowanych chorych, przy czym nie zaobserwowano znamiennych różnic pomiędzy grupami CKD5A i CKD5B, choć wiadomo, że neopteryna jest wykorzystywana m.in. do oceny stopnia zaawansowania chorób sercowo-naczyniowych. Stąd brak różnic między tymi grupami mógłby zostać wykorzystany do zakwestionowania jej użyteczności. Z drugiej strony bardzo mała liczebność omawianych grup nie uprawnia do wyciągania kategoriycznych wniosków. Choć wyniki badań dotyczących zmian stężeń neopteryny w chorobie wieńcowej są niejednoznaczne. Auer [7], w badaniu przeprowadzonym na 116 osobach, w tym 25 z niestabilną chorobą wieńcową, 31 z objawami klinicznymi stabilnej choroby wieńcowej oraz 60 zdrowych, nie zauważył znamiennych statystycznie różnic w stężeniu neopteryny w badanych grupach. Z drugiej strony wiadomo, że w chorobach sercowo-naczyniowych obserwuje się zwiększoną ilość leukocytów, szczególnie monocytów/makrofagów oraz ich wzmożoną aktywność, która wiąże się ze wzrostem stężenia neopteryny [325]. Zauważono, że wzrost stężenia neopteryny może być następstwem pęknięcia blaszki miażdżycowej, a także może odzwierciedlać ilość zmienionych miażdżycowo tętnic [325]. W badaniu *Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Heart Study* [96], neopteryna okazała się być bardzo dobrym wskaźnikiem całkowitej oraz sercowo-naczyniowej śmiertelności w grupie osób poddawanych angiografii. W obecnym badaniu stężenie neopteryny w surowicy krwi w grupie dializowanych chorych także wiązało się ze zwiększonym ryzykiem zgonu, w którym względny współczynnik ryzyka wynosił 1,003. W ciągu roku obserwacji chorzy hemodializowani, charakteryzujący się podwyższonym stężeniem neopteryny, mieli prawdopodobieństwo przeżycia na poziomie 81,4%, w porównaniu ze 100% prawdopodobieństwem przeżycia wśród chorych z niższym stężeniem.

### *Interleukina-18*

Kolejnym badanym parametrem była IL-18. Stężenie tej cytokiny zmieniało się w zależności od funkcji nerek, choć zdecydowane statystycznie istotne różnice zauważono jedynie pomiędzy chorymi z grupy CKD5B a pozostałymi badanymi oraz pomiędzy CKD3-4 i HV. Chorzy z grupy CKD5B wykazywali zdecydowanie najwyższe stężenia IL-18 w surowicy krwi. Dlaczego tak znamienny wzrost obserwowano jedynie w grupie CKD5B? Odpowiedź na to pytanie znajdziemy, podobnie jak to było w przypadku neopteryny, we współistniejących obok siebie zaburzeniach zapalnych, immunologicznych i obecności nasilonego stresu oksydacyjnego w grupie hemodializowanych chorych. IL-18 jest plejotropową cytokiną wytwarzaną przez makrofagi oraz inne komórki należące do rodziny IL-1. Pełni m.in. rolę kostymulatora syntezy IFN- $\gamma$ , ponieważ odpowiada za pobudzenie

limfocytów T i komórek NK do wytwarzania IFN- $\gamma$ , w odpowiedzi na obecność patogenu [224, 225]. Makrofagi aktywowane przez IFN- $\gamma$  wywołują syntezę metaloproteinaz i neopteryny [7]. Dodatkowo IL-18 działa synergistycznie z IL-12 i doprowadza do powstania limfocytów Th1, wykazuje działanie prozapalne, a także nasila przyleganie cząsteczek adhezyjnych. Wszystkie te procesy są bardzo istotne w przebiegu miażdżycy. Jak już kilkakrotnie wspomniano, miażdżycy w PChN różni się co najmniej pod względem nasilenia zmian w naczyniach od tej klasycznej stwierdzanej wśród chorych z prawidłową funkcją nerek. Z drugiej strony wydaje się, że należałoby tu jeszcze wyróżnić miażdżycę chorych z PChN niedializowanych i hemodializowanych. Sama przecież hemodializa indukuje pojawienie się licznych zaburzeń sprzyjających miażdżycy.

Aby przyjrzeć się bliżej zależnościom, jakim podlega stężenie IL-18 przeprowadzono jednoczynnikową analizę korelacji. Na jej podstawie wykryto istnienie współzależności pomiędzy stężeniem IL-18 a BMI, czasem leczenia dializami, grubością blaszki miażdżycowej, glikemią, leczeniem inhibitorami angiotensyny, ferrytyną (zachowującą się w tej sytuacji jak dodatnie białko ostrej fazy), stężeniem iPTH, stężeniem triglicerydów, cholesterolu całkowitego i LDL-cholesterolu. Z kolei odwrotne zależności odnotowano w przypadku leczenia statynami, stężenia HGB, wielkości HCT, stężenia żelaza, stężenia cholesterolu HDL, białka całkowitego oraz wielkości eGFR. Choć, właściwie większość z tych ujawnionych korelacji była zgodna z oczekiwaniami, to niektóre wymagają krótkiego komentarza. Obserwowana w badaniu dodatnia zależność pomiędzy przyjmowaniem inhibitorów konwertazy angiotensyny a stężeniem IL-18 jest zastanawiająca, tym bardziej, że ACEI działają korzystnie na śródbłonek naczyniowy, nasilają fibrynoлизę, działają przeciwutleniająco, hamują powstawanie angiotensyny i zwiększają aktywność bradykininy. Dlaczego zatem to korzystne działanie ACEI wiązało się z nasileniem zapalno-immunologicznych procesów, których jednym z ogniw jest IL-18? Być może była to kwestia małej liczebności grupy badanych przyjmujących te leki i stąd ta zaskakująca korelacja, odmienna od tych obserwowanych w innych badaniach [267]. Z kolei obserwowana dodatnia zależność IL-18 ze stężeniem iPTH jest w pewnym sensie oczywista. W badaniu występują obok siebie zmiany zapalno-immunologiczne, których odzwierciedleniem są obserwowane zmiany stężeń IL-18 połączone z zaburzeniami gospodarki wapniowo-fosforanowej. Przy tej okazji przyjrzymy się tym zaburzeniom, ponieważ wywierają one istotny wpływ na zmiany miażdżycowe w PChN i na pewno miały swój udział w przypadku zmian obserwowanych wśród badanych chorych. W przeprowadzonym badaniu, w oparciu o wyniki przedstawione w celu charakterystyki grup zauważalne są różnice w metabolizmie wapniowo-fosforanowym pomiędzy pacjentami z PChN a pozostałymi badanymi oraz pomiędzy grupami CKD1–2, CKD3–4 a CKD5. Widać wyraźny narastający wzrost stężenia fosforanów oraz iPTH w surowicy krwi w miarę pogarszania się funkcji nerek, z kulminacją zmian w grupie CKD5. Jeśli chodzi o stężenie całkowitego wapnia, to pozostawało ono

we wszystkich grupach na poziomie stężeń prawidłowych, co zapewne wynikało z leczenia zaburzeń wapniowo-fosforanowych wśród chorych z PChN. Prawidłowe stężenia wapnia obserwowane wśród badanych chorych nie wykluczały istnienia zaburzeń, ponieważ istotny dla ich stwierdzenia jest m.in. nieprawidłowy iloczyn wapniowo-fosforanowy. Z drugiej strony widoczna była niewielka tendencja do wzrostu stężenia wapnia, szczególnie w grupie CKD5, co w sytuacji leczenia węglanem wapnia może świadczyć o istnieniu przynajmniej u niektórych chorych adynamicznej choroby kości, z towarzyszącym obniżonym iPTH. Należy tu wspomnieć, że te główne przedstawione zaburzenia są elementem wtórnej nadczynności przytarczyc, gdzie współwystępują obok siebie hiperfosfatemia, hipokalcemia, niedobory 1,25 dihydroksycholekalcyferolu, zmniejszenie liczby receptorów wapniowych i receptorów dla witaminy D oraz toksyny mocznicowe. Przyczyniają się one do rozwoju osteodystrofii mocznicowej oraz do odkładania wapnia w wielu tkankach miękkich i naczyniach krwionośnych [156]. Wapnienie naczyń jest wypadkową oddziaływania hiperfosfatemii indukującej wzrost osteokalcyny, nasilającej proliferację naczyniowych miocytów, oraz przyczyniającej się do zwiększonej sekrecji PTH, które to zjawiska powodują wapnienie naczyń. Czy jednak przyspieszone rozległe zwapnienie naczyń można uznać za czynnik ryzyka destabilizacji blaszek naczyniowych wśród dializowanych? Dotychczas sądzono że tak, aczkolwiek ostatnio większe znaczenie przypisuje się remodelingowi naczyń zależnemu od pobudzenia układu MMP [124], co zostanie szczegółowo omówione w dalszej części dyskusji.

Kolejną istotną zależnością wykazaną w obecnym badaniu była ujemna korelacja pomiędzy IL-18 a stężeniem HGB oraz wielkością HCT. Stężenie HGB znalazło się również w modelu najlepiej opisującym zmienność omawianej cytokiny, gdzie obok HGB pojawiły się hsCRP, iPTH, leczenie statynami, leczenie ACEI, całkowity cholesterol oraz eGFR, przy czym HGB, całkowity cholesterol i eGFR nie wykazywały statystycznej istotności. Związki pomiędzy HGB i IL-18 ukazują istotną rolę niedokrwistości w obrazie zaburzeń obserwowanych w PChN.

W badaniu obserwowano laboratoryjne wykładniki niedokrwistości w grupach CKD3–4 i CKD5. Przy czym w grupie pacjentów hemodializowanych były one najbardziej nasilone. Przyczyny niedokrwistości w PChN są złożone. Przede wszystkim kluczowe jest tu zmniejszone wytwarzanie erytropoetyny, powiązane z hamowaniem syntezy erytrocytów w szpiku przez toksyny mocznicowe, niedoborem czynników krwiotwórczych oraz skróconym czasem przeżycia erytrocytów. Istotny udział mają tu także czynniki zapalne, takie jak IL-1, TNF- $\alpha$ , które hamują erythropoezę szczególnie w jej późnej fazie. Stan zapalny jest wspólnym ogniwem patogenetycznym niedokrwistości i niewydolności serca w PChN. Wiadomo, że niedokrwistość bardzo znamienne wpływa na układ krążenia, powoduje niedostateczne utlenowanie tkanek, zwiększa obciążenie wstępne i zmniejsza obciążenie następcze lewej komory, przyczyniając się w konsekwencji do niewydolności serca. Silverberg wprowadził termin *cardio-renal-anemia*

*syndrome* w celu podkreślenia udziału tych trzech czynników, tj. niedokrwistości, niewydolności mięśnia sercowego oraz PChN w samonapędzającym się kole patogenetycznym. W PChN niedokrwistość wiąże się z upośledzeniem funkcji hemodynamicznej, zmniejszonym stężeniem albumin, cholesterolu oraz mniejszym wskaźnikiem BMI, co może wskazywać na częściowo niedoborowy charakter niedokrwistości w tej grupie chorych. W obecnym badaniu niedokrwistości dodatkowo towarzyszyły zaburzenia gospodarki żelazowej, będące głównie efektem stanu zapalnego. Chorzy charakteryzowali się obniżonym stężeniem żelaza, wywołanym upośledzeniem jego wchłaniania oraz zwiększonym stężeniem ferrytyny (pozytywnego białka ostrej fazy).

Wracając do IL-18, należy zaznaczyć, że w obecnym projekcie zaobserwowano istotny wpływ trzech zmiennych, tj. IMT, hsCRP i eGFR na stężenie IL-18. Wraz ze wzrostem IL-18 obserwowano pogrubienie kompleksu *intima-media*, (podobnie jak w: [177, 328]), narastanie upośledzenia funkcji nerek oraz nasilenie procesów zapalnych. Zauważono także że wzrost stężenia IL-18 związany jest z czasem leczenia dializami, co było zgodne z doniesieniami innych badaczy [86]. W celu oceny ryzyka sercowo-naczyniowego w grupie chorych hemodializowanych przeprowadzono analizy przeżycia, w oparciu o wielkość stężeń IL-18 (punkt odcięcia  $\geq 1411,5$  pg/mL). Zauważono, że wzrost stężenia IL-18 w grupie chorych hemodializowanych wiązał się ze zwiększonym ryzykiem zgonu w ciągu 12 miesięcy obserwacji, w porównaniu z osobami, których stężenia IL-18 w surowicy krwi były niższe, współczynnik hazardu równy 1,0009. Wyniki te potwierdziły znaczenie IL-18 w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego. Podobne wyniki uzyskali inni badacze [28, 44, 87, 191].

### **Białko C-reaktywne**

Kolejnym parametrem zapalnym ocenianym w rozprawie było białko C-reaktywne, zaliczane do tzw. nowych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Niektórzy badacze sugerują, że białko to jest raczej jedynie parametrem wskaźnikowym, inni wskazują na nie jako na czynnik sprawczy procesów zapalnych [42]. CRP jest istotnym mediatorem oraz efektem wielu zjawisk związanych z toczącym się lokalnym procesem zapalnym. Wytwarzanie CRP przez wątrobę jest pobudzane przez IL-1, IL-6, glikokortykosteroidy oraz produkty aktywacji dopełniacza. CRP wykazuje m.in. zdolność do wiązania szeregu antygenów drobnoustrojów, a także kompleksów immunologicznych, dzięki czemu uczestniczy zarówno w procesach odporności nieswoistej, jak i w ochronie przed procesem autoimmunologicznym. Według teorii „flip-flop”, w związku ze zmianą układu lipidów błony komórkowej, CRP posiada zdolność przyłączania się do powierzchni uszkodzonych komórek. Przez zmianę układu lipidów rozumiane jest zaburzenie architektury i utrata symetrii fosfolipidów błony komórkowej, w następstwie której dochodzi do ekspozycji uprzednio ukrytych ligandów zdolnych do wiązania CRP na powierzchni błony [6]. Obecność CRP na powierzchni komórek po

ekspozycji na niedokrwienie lub poddanych apoptozie sprzyja ich uszkodzeniu, prowadzi do wiązania i aktywacji dopełniacza oraz zależnego od jonów wapnia wiązania i agregacji cząsteczek LDL i VLDL. CRP stymuluje także uwalnianie czynnika tkankowego przez makrofagi. Złogi CRP w kompleksie z dopełniaczem lub cząsteczkami LDL znajdowano w głębokich warstwach intymy naczyń krwionośnych, blaszkach miażdżycowych, komórkach piankowatych oraz obszarach mięśnia serca objętych zawałem. Podwyższone stężenie CRP jest traktowane jak wyznacznik subklinicznej postaci miażdżycy, a także predyktor przyszłych incydentów zawału serca i udaru mózgu, niezależnie od innych czynników ryzyka zarówno u chorych dializowanych, jak i tych z mniejszym stopniem upośledzenia funkcji nerek. Chociaż przyczyny uogólnionego przewlekłego odczynu zapalnego u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek są złożone, to sam odczyn zapalny stanowi bodziec, który uszkadza ścianę naczyń i przyspiesza miażdżycę. W obecnym badaniu wielkości stężenia hsCRP wśród wszystkich badanych były zbliżone, a jedyna statystycznie istotna różnica dotyczyła grup CKD5B i HV. Na tej podstawie można by przypuszczać, że poziom nasilenia zmian zapalnych był wśród badanych chorych zbliżony. Z drugiej strony należy zwrócić uwagę na wpływ leków, takich jak statyny czy ACEI, których przyjmowanie w obecnym badaniu ściśle odwrotnie korelowało z wielkością hsCRP. Ponadto zaobserwowano zależność pomiędzy wzrostem stężenia hsCRP a obniżeniem wskaźnika funkcji nerek, obniżeniem stężenia białka całkowitego, albumin, żelaza, oraz wspomnianymi uprzednio lekami. Z kolei nie wykazano zależności pomiędzy hsCRP a parametrami lipidowymi czy wapniowo-foforanowymi. Zastanawiającym był brak wpływu hsCRP na przeżycie wśród hemodializowanych chorych, co mogło być wywołane m.in. leczeniem statynami. Wiadomo, że statyny wywierają działanie przeciwzapalne, a poprzez zmniejszenie syntezy TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6, wpływają na stężenie CRP w surowicy.

### *Stres oksydacyjny*

Spśród parametrów stresu oksydacyjnego w badaniu analizowano następujące: MMP-9, TIMP-1, wskaźnik MMP-9/TIMP-1, PON-1, MPO i ADMA. Wiadomo, że wzmożona aktywność wolnorodnikowa stwierdzana wśród pacjentów z PChN jest wypadkową zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu i niedostatecznej aktywności enzymatycznych i nieenzymatycznych układów antyoksydacyjnych. Przyczyny tej wzmożonej aktywności nie są do końca zrozumiałe. Ich występowanie tłumaczy się głównie zaburzeniami w gospodarce metalami śladowymi (selen, cynk i miedź), przewlekłym niedotlenieniem tkanek oraz obecnością niektórych toksyn mocznicowych. Także współistniejący z chorobą nerek stan zapalny oraz niedożywienie mogą odgrywać tu ważną rolę. Podnosi się też kwestię przewodnienia, które poprzez zwiększenie przepuszczalności błony śluzowej jelit ułatwia przejście bakterii ze światła jelita do naczyń krwionośnych. Dodatkowo zwiększenie stężenia cytokin i metabolitów kwasu arachidonowego,



obserwowane w przebiegu PChN, wywołuje pobudzenie granulocytów, które ulegają następnie wybuchowi tlenowemu. W ten sposób uwalniane są ROS, które mogą wywoływać wiele niekorzystnych zjawisk, głównie w wyniku peroksydacji lipidów błon komórkowych. Zjawisko to jest szczególnie nasilone u pacjentów hemodializowanych, u których zarówno oddziaływanie środowiska mocznikowego, jak i sama hemodializa nasilają to zaburzenie. Wzmoczonej produkcji ROS z jednej strony towarzyszy wspomniana upośledzona sprawność mechanizmów antyoksydacyjnych widoczna zarówno w przypadku erytrocytów, jak i samego osocza. Objawia się ona m.in. obniżonym poziomem dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy.

Podsumowując można zauważyć, że stres oksydacyjny w chorobach nerek może być następstwem zarówno niewydolności układu antyoksydacyjnego, jak i zwiększonego wytwarzania ROS. Użytecznym narzędziem do jakościowego i ilościowego określania zjawisk wolnorodnikowych są laboratoryjne markery stresu oksydacyjnego.

### *MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1*

Istotne znaczenie dla dalszego pogłębiania zmian miażdżycowych ma aktywacja miocytów błony środkowej, co przejawia się ich proliferacją i migracją w głąb błony wewnętrznej naczynia. Uaktywnione miocyty, podobnie jak makrofagi, wykazują zdolność do fagocytowania lipidów zgromadzonych w błonie wewnętrznej, co w konsekwencji powoduje ich transformację w komórki piankowate. Aktywne miocyty cechują się również zdolnościami do syntezy IL-1, TNF- $\alpha$  oraz elastyny, kolagenu, proteoglikanów, odkładanych w obrębie blaszki, co jest przejawem procesu naprawczego [197]. Akumulacja w blaszce macierzy pozakomórkowej wynika z zachwiania równowagi między jej produkcją oraz enzymatyczną degradacją [83]. Rozpad składowych macierzy pozakomórkowej zachodzi przede wszystkim dzięki produkcji metaloproteinaz, które trawią kolagen, elastynę i proteoglikany [303]. Głównym źródłem MMPs są SMCs oraz makrofagi. Wśród licznych enzymów z rodziny MMPs istotną rolę w chorobach układu sercowo-naczyniowego odgrywają MMP-2 i MMP-9 (nazywane też żelatynazami A i B) [51]. Aktywność proteolityczna MMPs podlega ściślejszej regulacji pod wpływem endogennych tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases*, TIMP). W tkankach MMPs występują w kompleksach z inhibitorami (TIMPs). Stosunek ekspresji MMP-9/TIMP-1 określa aktywność MMP-9 *in vivo*. Zaburzenia równowagi w układzie MMPs/TIMPs prowadzą do nasilonej proteolizy, uszkodzenia śródbłonna oraz kumulacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej, tj. białek kolagenowych, białek niekolagenowych i proteoglikanów, co w konsekwencji przyczynia się do przebudowy struktury macierzy, a w późniejszym okresie do pęknięcia blaszki miażdżycowej [162]. Czynniki tkankowe, który inicjuje zewnętrzną kaskadę krzepnięcia odgrywa centralną rolę w osłabianiu pokrywy włóknistej przez stymulowanie proteinaz degradujących matrix [180].

Pęknięcie blaszki zaczyna się od pęknięcia pokrywy włóknistej lub erozji wewnętrznej warstwy śródbłonna. Powierzchnia blaszki miażdżycowej podlega nieustannie dynamicznemu remodelingowi, poprzez następujące po sobie zjawiska pęknięcia, zakrzepicy i procesów gojenia. Ostatnio zgromadzono wiele dowodów, które podkreślają, iż najważniejszym czynnikiem patogenetycznym destabilizacji blaszki jest zwiększona ekspresja MMP. W wielu chorobach nerek stwierdzono wzrost ekspresji MMP-9. Wiadomo, że proces zapalny wpływa na ekspresję i sekrecję MMP. W najnowszych badaniach wykazano związek TIMP-1 z ryzykiem udaru mózgu i zawału serca, niezależnym od wielkości stężenia CRP i innych czynników ryzyka [107]. Podobną niezależnością od uznanych parametrów ryzyka sercowo-naczyniowego charakteryzował się TIMP-1. Może to świadczyć o tym, iż procesy związane z metabolizmem MMP-9 i TIMP-1 są ważne *per se*. W obecnym badaniu obserwowano statystycznie istotne różnice w zakresie stężeń tego parametru pomiędzy grupami CKD1–2, CKD3–4 a CKD5. Natomiast różnice pomiędzy grupami CKD5A i CKD5B były nieznamiennie statystycznie. Z kolei chorzy CVD mieli zbliżone stężenia do tych stwierdzanych wśród pacjentów CKD3–4 i CKD5A. Trzeba zaznaczyć, że wszyscy badani chorzy wykazywali statystycznie istotnie podwyższone stężenia w surowicy MMP-9 w porównaniu z osobami zdrowymi. Tymczasem, jeśli chodzi o inhibitor dla MMP-9, to w obecnym badaniu widać było wzrost stężeń TIMP-1 we wszystkich grupach chorych w porównaniu do HV. Przy czym różnice pomiędzy grupą CKD5B a pozostałymi grupami w tym zakresie oraz wśród grup z PChN były statystycznie nieistotne. Z kolei pacjenci CVD wykazywali jedynie znamienne różnice w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie CKD3–4. A chorzy grup CKD1–2, CKD3–4 i CKD5A różnili się wielkością TIMP-1 w porównaniu do HV. Ciekawe w tej sytuacji okazały się wyniki analizy wskaźnika MMP-9/TIMP-1, który osiągał najwyższe wartości w grupach CKD5B i CVD oraz zbliżony w grupach CKD1–2 i CKD3–4. Można na tej podstawie zauważyć, że wzrost wskaźnika MMP-9/TIMP-1 w grupach CVD i CKD5 był związany z nasileniem MMP-9 i względnie słabszym wydzielaniem TIMP-1. Wygląda na to, że w obliczu wzrostu stężenia MMP-9, wzmożone wydzielanie TIMP-1 nie było w stanie skompensować dużej aktywności MMPs, szczególnie nasilonej u pacjentów hemodializowanych. Zaobserwowano, że wielkość wskaźnika MMP-9/TIMP-1 w istotny sposób wpływała na przeżycie chorych leczonych hemodializą, współczynnik hazardu był równy 1,179. Można więc zauważyć, że wzrost tego wskaźnika wiązał się z krótszym przeżyciem wśród chorych leczonych HD. Jednoczynnikowa analiza korelacji pomiędzy MMP-9 i TIMP-1 wykazała istnienie współzależności pomiędzy MMP-9/TIMP-1 a czasem leczenia dializami, grubością blaszki miażdżycowej, oraz stężeniem ferrytyny, która pełniła rolę białka ostrej fazy i może działać prooksydacyjnie poprzez uwalnianie żelaza. Natomiast odwrotną zależność zaobserwowano pomiędzy analizowanym wskaźnikiem a leczeniem ACEI, statynami oraz parametrami gospodarki lipidowej. Ciekawe wyniki uzyskano w analizie re-

gresji wieloczynnikowej. Spośród licznych parametrów, które wzięto pod uwagę aby stworzyć model najlepiej opisujący zmienność MMP-9/TIMP-1, jedynie wiek okazał się być znamienny. Z kolei Pawlak i wsp. [232] w przeprowadzonej analizie wykazali u pacjentów leczonych hemodializą zwiększenie stężenia  $\beta$ -chemokin i wzrost stosunku TIMP-1/MMP-9, co pozostaje w sprzeczności z wynikami uzyskanymi w obecnym badaniu. W obecnym badaniu obserwowano wzrost wskaźnika MMP-9/TIMP-1 wśród hemodializowanych i pacjentów grupy CVD.

## ADMA

ADMA jest endogennym kompetycyjnym inhibitorem eNOS, dzięki czemu może poważnie modyfikować czynność śródbłonna. Wspólna lokalizacja NOS oraz DDAH (enzymu katalizującego reakcję przekształcania ADMA w cytrulinę i dimetyloaminy) w wielu komórkach stała się podstawą do sformułowania hipotezy, zgodnie z którą stężenie ADMA wewnątrz komórki jest czynnikiem determinującym ilość tlenu azotu syntezowanego w danym mikrośrodowisku. Niektórzy badacze uważają, że stężenie ADMA w surowicy jest efektem „przelania się” tego aminokwasu z komórek śródbłonna naczyń. W obecnym badaniu stężenie ADMA było statystycznie istotnie wyższe w grupach CKD3–4, CKD5A i CKD5B w porównaniu z wynikami obserwowanymi w grupach CVD, CKD1–2 i HV. Zapewne na taki wynik miała po części wpływ narastająca upośledzona funkcja nerek, która jest kluczowa dla usuwania tego związku z organizmu. W badaniu ujawniono zależność pomiędzy stężeniem ADMA a wielkością przesączania kłębuszkowego. Stężenie ADMA korelowało (korelacja dodatnia) z czasem leczenia dializami, grubością blaszki miażdżycowej, stężeniem ferrytyny oraz wielkością iPTH. Z kolei odwrotne zależności ujawniono pomiędzy ADMA a leczeniem statynami, stopniem niedokrwistości (stężenie HGB i wielkość HCT), stężeniem żelaza, profilem lipidowym, z wyjątkiem TAG. Czyli w miarę zmniejszania się stężenia HDL, LDL i całkowitego cholesterolu w surowicy krwi narastało stężenie ADMA. Można na tej podstawie wywnioskować, że miało tu miejsce zjawisko „reverse epidemiology”, zgodnie z którym im pacjent ma wyższe stężenie cholesterolu w surowicy tym lepiej rokuje. Zastanawiając się nad przyczynami wzrostu stężenia ADMA wśród pacjentów hemodializowanych warto dodać, że na stężenie ADM ma na pewno wpływ katabolizm białek, szczególnie nasilony w hemodializie. Analiza regresji wieloczynnikowej, w której uwzględniono wiek, BMI, wskaźniki lipidowe, morfologii krwi, gospodarki żelazowej, wapniowo-fosforanowej, mocznik, albuminy, białko całkowite, IMT i eGFR ujawniła, że jedynie wiek i tylko w 10,7% w statystycznie istotny sposób tłumaczył zmienność ADMA. Co z pozostałymi prawie 90%. Wydaje się, że na uzyskany wynik miała wpływ zbyt mała liczebność badanej grupy, bo trudno przypuszczać, że zapomniano uwzględnić jakiś kluczowy parametr. Ponadto w obecnym badaniu ujawniono wpływ stężenia ADMA na przeżycie wśród pacjentów hemodializowanych, HR = 3,95, co oznacza, że pacjent hemodializowany, którego stężenie ADMA w su-

rowicy krwi było podwyższone miał 3,95 razy większe ryzyko zgonu w okresie 12-miesięcznej obserwacji w porównaniu z hemodializowanym pacjentem, którego cechowało niższe stężenie ADMA w surowicy. I tak na przykład 12 miesięcy przeżyło 100% hemodializowanych pacjentów z niższym ADMA i jedynie 61,5% chorych hemodializowanych ze stężeniem ADMA wyższym. Uzyskane wyniki były podobne do tych opisanych w „Lancet” przez Zoccaliego [331]. Zaobserwował on wraz z zespołem, że ADMA jest najsilniejszym, niezależnym czynnikiem predykcyjnym zdarzeń sercowo-naczyniowych i całkowitej umieralności chorych leczonych przewlekłą powtarzaną hemodializą. Na początku tego badania chorzy z najwyższym stężeniem ADMA wykazywali trzykrotnie większe ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych niż pacjenci z wyjściowo niskim stężeniem ADMA w surowicy krwi.

### MPO

Mieloperoksydaza była kolejnym ocenionym w badaniu białkiem. Jest ona enzymem zmagazynowanym w ziarnistościach neutrofilów i makrofagów, który katalizuje reakcje jonu chlorkowego i nadtlenu wodoru do antybakteryjnego podchlorynu. MPO jest zaangażowana w proces inicjowania i rozwoju miażdżycy na kilku jej etapach [233]. Bierze udział m.in. w peroksydacji lipidów, wpływa na dysfunkcyjne działanie HDL oraz na katalityczne zużycie NO. Przyczynia się do dysfunkcji śródbłonna, wędrówki leukocytów oraz gromadzenia komórek piankowatych. Jej działanie polega m.in. na aktywacji MMP, promowaniu apoptozy komórek śródbłonna. Wszystko to razem prowadzi do destabilizacji blaszki miażdżycowej i przerwania jej ciągłości, a co się z tym wiąże do uwalniania czynnika tkankowego i następnej aktywacji kaskady krzepnięcia. MPO działa w ten sposób, że zużywa NO i tym samym zmniejsza jego biodostępność i przyczynia się do wszelkich zaburzeń z tym związanych. Zauważono, że MPO może być wykładnikiem ryzyka wieńcowego niezależnym od innych czynników ryzyka i markerów zapalnych, a także że ocena stężenia MPO niezależnie od stężenia białka CRP i innych markerów pozwala przewidzieć ryzyko sercowo-naczyniowe. W obecnym badaniu najwyższymi stężeniami charakteryzowali się pacjenci hemodializowani. Stężenie MPO wzrastało w zależności od stopnia upośledzenia funkcji nerek (ujemna korelacja MPO i eGFR), choć różnice pomiędzy chorymi z PChN nie zawsze były statystycznie nieznamienne. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami CKD5A i CKD5B. Stężenie MPO w badaniu korelowało dodatnio z czasem leczenia HD oraz grubością blaszki miażdżycowej (IMT). Z drugiej strony wykryto zależności o charakterze ujemnej korelacji pomiędzy MPO a leczeniem ACEI, stężeniem HGB, wielkością HCT, stężeniem żelaza i ferrytyny, całkowitego cholesterolu, LDL-cholesterolu, albumin. Szczególnie ciekawe są zależności wykryte w przypadku albumin i parametrów gospodarki lipidowej. Ukazują nam one zjawisko, w którym im niższe są profile lipidowe tym wyższe jest stężenie MPO u badanych. Znowu widzimy

proces odwrotny niż ma to miejsce w klasycznych chorobach sercowo-naczyniowych. Gdy do analizy korelacyjnej wybrano jedynie pacjentów CVD, to zauważano zmianę charakteru zależności, tj. wykryto dodatnią korelację pomiędzy stężeniem całkowitego cholesterolu (wyniki niepokazane w rozprawie). Na tej podstawie można mówić o pewnej odrębności procesów towarzyszących miażdżycy klasycznej i towarzyszącej PChN. Co ciekawe, w badaniu, wbrew przewidywaniom nie odnotowano wpływu stężenia MPO na przeżycie wśród hemodializowanych chorych.

### *PON-1*

Ostatnim badanym parametrem w tym panelu była paraoksonaza, enzym, którego główna rola polega na ochronie frakcji LDL przed utlenieniem pod wpływem ROS. W ten sposób PON-1 zapobiega powstawaniu aterogennych cząsteczek ox-LDL i hamuje procesy aterogenezy. Wiadomo, że w populacji rozpowszechnione są dwie polimorficzne formy PON-1 o różnych aktywnościach, istotne są też wpływy środowiskowe, wśród których są dieta, alkohol, nikotyna. Wyniki badań stężenia PON-1 w chorobie niedokrwiennej były niejednoznaczne. W obecnym badaniu stężenie PON-1 było najbardziej obniżone w grupie chorych hemodializowanych. Nie odnotowano różnic w zakresie stężeń PON-1 pomiędzy grupami CKD3–4, CKD5A i CKD5B. Z kolei wspomniane grupy różniły się w odniesieniu do HV, CVD i CKD1–2. Analiza jednoczynnikowa korelacji ukazała istnienie zależności (o charakterze dodatniej korelacji) pomiędzy PON-1 a eGFR, białkiem całkowitym, HDL-cholesterolem, żelazem, hemoglobina i hematokrytem. Natomiast ujemne korelacje zostały stwierdzone w przypadku iPTH, ferrytyny, obecności nadciśnienia tętniczego i długości czasu leczenia dializami. Na ich podstawie widać wyraźnie, że nasilone procesy zapalno-oksydacyjne zmniejszały stężenie tego enzymu. Ciekawych wyników dostarczyła analiza funkcji przeżycia wśród hemodializowanych, gdzie HR = 6,85. Szansa na przeżycie 12-miesięcznego okresu czasu w grupie z obniżonym PON-1 była zdecydowanie niższa (33%) w odniesieniu do osób z wyższym stężeniem PON-1 (86,6%).

## Ocena ryzyka sercowo-naczyniowego

### *NT-proBNP*

Peptydy natriuretyczne, których przedstawicielem jest NT-proBNP są oligopeptydowymi neurohormonami uczestniczącymi w regulacji gospodarki wodnosodowej i utrzymaniu homeostazy układu sercowo-naczyniowego. Powodują on m.in. zwiększenie filtracji kłębuszkowej i zmniejszenie resorpcji zwrotnej sodu w nerce oraz hamują wydzielanie reniny i aldosteronu. Ponadto hamują aktywność współczulnego układu nerwowego i bezpośrednio rozszerzają naczynia krwionośne. Stężenie NT-proBNP wzrasta w dysfunkcji skurczowej i rozkurczowej mięśnia sercowego i koreluje ze stopniem zaawansowania niewydolności

serca. Wzrost stężenia Nt-proBNP jest wyrazem aktywacji mechanizmów kompensacyjnych, do której dochodzi przed pojawieniem się objawów niewydolności serca. W obecnym badaniu najwyższymi stężeniami Nt-proBNP charakteryzowali się pacjenci hemodializowani. Stężenie NT-proBNP korelowało z czasem leczenia dializami, grubością blaszki miażdżycowej, stężeniem ferrytyny i iPTH. Można zauważyć, że zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej (iPTH) i nasilone procesy zapalne zapewne miały wpływ na podwyższone stężenie NT-proBNP. Zaskakującym wynikiem był brak wpływu stężenia tego peptydu w surowicy krwi na prawdopodobieństwo przeżycia chorych hemodializowanych, tym bardziej, że wpływ ten był udokumentowany w wielu badaniach. Wydaje się, że kluczowe znaczenie mogła tu odgrywać bardzo mała liczebność porównywanych ze sobą grup.

W obecnym badaniu paradoksalnie, te parametry, które mają swoją ugruntowaną pozycję w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego, tj. hsCRP i NT-proBNP, nie wykazywały istotnego w grupie hemodializowanych chorych wpływu na przeżycie. Z kolei wybrane ocenione parametry wykazywały istotny statystycznie wpływ na przeżycie w grupie hemodializowanych chorych, neopteryna z HR = 1,003 (95% CI 1,001–1,004), IL-18 z HR = 1,0009 (95% CI 1,0009–1,001), MMP-9/TIMP-1 z HR = 1,179 (95% CI 1,071–1,298); ADMA z HR = 3,95 (95% CI 0,79–19,65); PON-1 HR = 6,85 (95% CI 1,43–32,66), gdzie HR – to współczynnik hazardu, a 95% CI to 95% przedział ufności. Na podstawie tych wyników można zauważyć, że największy wpływ na 12-miesięczne przeżycie chorych hemodializowanych w obecnym badaniu miały stężenie ADMA i PON-1.

Należy tutaj podkreślić, że sama PChN jest jednym z najważniejszych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. W badaniu wielkość eGFR wpływała istotnie na przeżycie (P = 0,017, HR = 0,93, 95% CI 0,88–0,99).

*Identyfikacja białek odgrywających istotną rolę w procesie powstawania miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek i porównanie otrzymanych wyników z wynikami uzyskanymi od chorych z niestabilną chorobą wieńcową i/lub zawałem serca oraz zdrowych ochotników – w badaniach wstępnych zauważono bowiem istotne zmiany w proteomie chorych*

Sposób badania proteomu różni się w istotny sposób od klasycznych technik biochemicznych wykorzystywanych do badania białek [161]. Stosowanie tradycyjnych metod genomicznych jest w przypadku genomiki niewystarczające, gdyż białko – egzekutor przemian biochemicznych, ulega licznym modyfikacjom i wchodzi w interakcje, których nie da się ustalić na podstawie sekwencji jego genu [187]. Jednym z najbardziej popularnych podejść proteomicznych jest tzw. proteomika porównawcza, którą stosuje się w celu znalezienia biomarkerów badanego procesu. Poprzez porównanie profili białkowo-peptydowych próby kontrolnej z próbą badaną uzyskuje się informacje o zmianach jakościowych i ilościowych wywołanych danym czynnikiem. W badaniach wstępnych wykryto

kilka białek, tj. transferynę,  $\gamma$ -fibrynogen, mikroglobulinę, którymi różniły się cztery analizowane próbki, jednak trudno ze względu na małą liczebność grupy badanej analizować ujawnione zmiany, aczkolwiek widać wyraźnie, że to są zmiany świadczące o procesie zapalnym.

Natomiast ujawnione zmiany akumulacji białek w obecnym projekcie świadczą wyraźnie o dużym udziale procesów zapalno-immunologicznych oraz stresu oksydacyjnego w miążdżycy chorych na PChN. Zmiany te nasilają się w miarę upośledzenia funkcji nerek, i są najbardziej widoczne w grupie chorych dializowanych, zwłaszcza tych, którzy zmarli w ciągu 12-miesięcznej obserwacji. Ciekawy jest fakt, że analiza porównawcza proteomów grup CKD i HV oraz CVD i HV ujawniła różnice we względnej akumulacji dokładnie tych samych czterech białek, tj.  $\alpha$ -1 mikroglobuliny, apolipoproteiny IV, fibrynogenu i haptoglobiny. Wykrycie tych samych białek dowodzi, że ewentualne różnice pomiędzy grupami CKD i CVD będą w głównej mierze miały charakter ilościowy a nie jakościowy. W przypadku alfa-1 mikroglobuliny, lipokaliny o właściwościach immunoregulatorowych i antyoksydacyjnych, najwyższy poziom akumulacji obserwowano w grupie zmarłych chorych hemodializowanych. Korelował on ujemnie z funkcją nerek ocenianą na podstawie wielkości eGFR. Alfa-1 mikroglobulina jest przez wielu badaczy określana mianem „śmietnika dla rodników”, ponieważ wykazuje zdolność wyłapywania hemu i innych utlenionych cząsteczek, hamuje reakcje oksydacji i dodatkowo jako reduktaza powoduje redukcję szkodliwych produktów utleniania. Jej czwarty mechanizm anty-oksydacyjny jest związany z jej nasilonym działaniem, wywołanym zwrotnie na skutek wzrostu stężenia hemu i innych pro-oksydantów [227]. Z kolei właściwości immunoregulatorowe tej małej cząsteczki wynikają z jej zdolności do częściowego zahamowania odpowiedzi immunologicznej limfocytów i neutrofilów [2]. Z drugiej strony należy pamiętać, że  $\alpha$ -1 mikroglobulina jest wydalana przez nerki, tak więc w wyniku niewydolności nerek jej stężenie w surowicy wzrasta. Prawdopodobnie nie była to jednak jedyna przyczyna obserwowanej wysokiej kumulacji tego białka wśród chorych CKD5. Istotny wpływ miała także jego funkcja antyoksydacyjna, zważywszy na fakt, że zjawisko stresu oksydacyjnego było najbardziej nasilone wśród hemodializowanych chorych (najwyższe stężenie ADMA, MPO, najwyższy wskaźnik MMP-9/TIMP-1 oraz najniższe stężenie PON-1).

Kolejnym białkiem, które wykazywało różną względną akumulację w analizach porównawczych proteomów grup CKD oraz CVD i kontroli była apolipoproteina IV (apo A-IV). Glikoproteina ta jest wydzielana tylko i wyłącznie przez komórki jelita cienkiego w ludzkim organizmie w odpowiedzi na wchłanianie kwasów tłuszczowych. Podobnie jak to było w przypadku alfa-1 mikroglobuliny, apo A-IV wykazuje właściwości anty-oksydacyjne i anty-miążdżycowe (aktywuje LCAT, moduluje aktywność lipazy lipoproteinowej oraz reguluje transport estrów cholesterolu z frakcji HDL cholesterolu na frakcję LDL-cholesterolu) [157]. Wzrost akumulacji apo A-IV w obecnym badaniu szczególnie wyraźnie był wi-

doczny w grupie chorych hemodializowanych, co zważywszy na właściwości biologiczne tej cząsteczki nie było wcale zaskoczeniem. Nasilone zjawisko stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego obserwowane w miarę narastania upośledzenia funkcji nerek prowokowało z pewnością organizm do zwiększonej produkcji apo A-IV. Z drugiej strony pojawiało się od razu pytanie, dlaczego pacjenci z tak wysokim stężeniem apo A-IV mieli najgrubszą blaszkę miażdżycową? Przecież to właśnie podwyższone stężenie apo A-IV powinno ich przed miażdżycą chronić. Wygląda na to, że pomimo usilnych starań ich organizm nie był w stanie poradzić sobie z zaburzeniami, które kumulowały się wraz z narastaniem upośledzenia funkcji nerek. To niewystarczające radzenie sobie organizmu z nasilonym zapaleniem i stresem oksydacyjnym w schyłkowej niewydolności nerek widać po raz drugi w obecnym badaniu. Dla przypomnienia, podobne przypuszczenia można było wysnuć na podstawie analizy wyników MMP-9, TIMP-1 i MMP-9/TIMP-1, gdzie wzrost TIMP-1 był niewystarczający, aby poradzić sobie ze zwiększoną ekspresją MMP-9. Z kolei w grupie CVD spadek akumulacji apoAIV był bardzo znamieny. Uzyskane, podobne wyniki, tj. wzrost stężenia apo A-IV w grupie chorych z PChN niektórzy badacze próbowali tłumaczyć zmniejszonym katabolizmem nerkowym apo A-IV obserwowanym w przypadku niewydolności nerek [157, 166]. Wpływ stosowanych leków, głównie statyn nie był istotny (nie odnotowano statystycznie znamiennych korelacji pomiędzy faktem przyjmowania statyn a akumulacją apo A-IV, a w analizie wieloczynnikowej dla apo A-IV znalazły się jedynie eGFR i hsCRP (wyniki nie przedstawione w rozprawie). O braku wpływów statyn na satężenie apo A-IV donosił również w swojej pracy Kollertis [157]. Wracając do wyników wspomnianej analizy wieloczynnikowej widać wyraźnie, że tak jak to było w przypadku wielu wcześniej analizowanych parametrów, na obserwowane zmiany akumulacji apo A-IV w przypadku chorych z PChN miały na pewno wpływ upośledzona funkcja nerek (spadek eGFR) i nasilone procesy zapalne (wzrost stężenia hsCRP). I choć jak już wspomniano, w obecnej pracy nie wykazano istotnego wzrostu stężenia hsCRP w surowicy badanych chorych w porównaniu do osób zdrowych, to jednak pewne zależności pomiędzy klasycznym markerem i zarazem „sprawcą” zmian zapalnych, tj. CRP a parametrami, substancjami, na które może mieć wpływ zostały zachowane. Z drugiej strony obniżenie akumulacji apo-AIV w grupie pacjentów CVD, czyli tych reprezentujących tzw., klasyczne czynniki ryzyka były zastanawiający. Być może u tych pacjentów, w obliczu występowania tradycyjnych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego i podjętych działań profilaktycznych mających na celu redukcję modyfikowalnych czynników ryzyka, w tym nadwagi i otyłości (obserwowanej w badaniu wśród tych chorych), zastosowana dieta ubogolipidowa (chorzy otrzymywali taką dietę podczas pobytu w Oddziale Klinicznym Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych) wpływała na zmniejszoną sekrecję apo A-IV w jelitach. Z drugiej strony może apo A-IV była po prostu wykorzystywana do transportu zwrotnego cholesterolu, jak to tłumaczy Kronenberg, i w ten



sposób po prostu zużywana [167]. Podsumowując można przyjąć, że na stężenie apo A-IV w surowicy mają wpływ nadmiar przyjmowanych lipidy, ale w obliczu narastającego stresu oksydacyjnego nie jest to jedyny, albo co najmniej nie jest to najważniejszy czynnik stymulujący sekrecję tej apolipoproteiny. W przypadku pacjentów ze znacznym upośledzeniem czynności nerek ten czynnik, często w ogóle może nie występować, w obliczu ich nieożywienia, mocznicy i zaburzeń wchłaniania.

Relatywny wzrost akumulacji haptoglobiny w obecnym badaniu był szczególnie widoczny w grupach CVD, oraz CKD1-2 i CKD3-4. Haptoglobina, należąca do pozytywnych białek ostrej fazy, wiąże hemoglobinę i w ten sposób usuwa ją z krwioobiegu, chroniąc w ten sposób organizm przed stymulowanym przez żelazo wytwarzaniem ROS. Zaobserwowano bowiem, że wiązane hemoglobiny przez haptoglobinę zapobiega tworzeniu m.in. nadtlenków lipidowych oraz zapobiega syntezie prostaglandyn. Ponadto, białko to hamuje aktywację neutrofilii poprzez zahamowanie ich chemotaksji, produkcji nadtlenków i degranulacji. Jej wzrost świadczy o silnych procesach zapalnych i nasilonym zjawisku stresu oksydacyjnego, które stymulują wątrobę do produkcji haptoglobiny [131]. Jednocześnie ten sam wzrost w przebiegu procesów zapalnych jest traktowany jako istotny element naprawy tkanek [131]. Z drugiej strony zastanawiającym jest fakt względnego obniżenia akumulacji haptoglobiny obserwowany w obecnym badaniu w przypadku chorych hemodializowanych. Być może istotne znaczenie odgrywają tu dwa dodatkowe czynniki. Pierwszym z nich jest dożylne leczenie żelazem pacjentów dializowanych, gdzie haptoglobina jest w tej sytuacji syntetyzowana w dużych ilościach, ale też intensywnie jest wykorzystywana. Drugim czynnikiem może być krótszy czas przeżycia erytrocytów w mocznicy i w tej sytuacji dochodzi do ich szybszego rozpadu, a tym samym do zwiększonego zużycia haptoglobiny. Jest to trochę sytuacja podobna do tej, jaka ma miejsce w niedokrwistości hemolitycznej, oczywiście w mocznicy występuje ona na zdecydowanie mniejszą skalę.

Ostatnim białkiem, które wykazywało różną względną akumulację w analizach porównawczych proteomów grup CKD oraz CVD i kontroli był fibrynogen. Fibrynogen należy do białek ostrej fazy wytwarzanych w wątrobie. W procesie krzepnięcia przekształcany jest w fibrynę. Wzrost względnej kumulacji fibryno-geny obserwowany w grupie pacjentów z CVD oraz CKD, również można wytłumaczyć nasilonym zjawiskiem stresu oksydacyjnego. Na wzrost stężenia tego białka może mieć również wpływ sama PChN, w której obserwuje się tendencję do hiperfibrynogenemii. Mechanizmy wpływu podwyższonego stężenia fibryno-geny na procesy miażdżycy są częściowo poznane [86]. Wiadomo, że stymuluje on chemotaksję i proliferację komórek uczestniczących w procesie tworzenia blaszki miażdżycowej, nasila adhezję i agregację płytek krwi, zwiększa lepkość krwi oraz współdziała w procesie aterogenezy z lipoproteinami. Podwyższone stężenie fibryno-geny jest z jednej strony wyrazem wzmożonej krzepliwości, ale

także, jako, że fibrynogen to białko ostrej fazy, wzrost jego stężenia świadczy o nasilonym stanie zapalnym.

*Analiza modyfikacji posttranslacyjnych zachodzących pod wpływem miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek oraz wśród pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym w wywiadzie, lecz bez klinicznych i laboratoryjnych cech upośledzenia funkcji nerek*

Modyfikacje posttranslacyjne białek mogą wpływać na ich właściwości chemiczne i fizyczne, ich stabilność i aktywność, a zatem na funkcje białek. Przeprowadzona analiza modyfikacji posttranslacyjnych ukazała różnice pomiędzy badanymi grupami w tym zakresie. Na początku wykryto dwa białka o odmiennej fosforylacji w grupach CVD i CKD5 w porównaniu do pozostałych grup. Białkiem tym było białko wiążące witaminę D. Z kolei analiza białek niskocząsteczkowych umożliwiła ujawnienie ośmiu niskocząsteczkowych białek, które różnicowały wszystkie grupy pacjentów. Jednak ze względu na niedoskonałości techniczne wykorzystywanego sprzętu nie udało się na podstawie masy tych białek ustalić co to były za białka. Zauważono jednak, że profile tych ośmiu białek były bardzo podobne w grupach CKD1–2 i CVD oraz zdecydowanie odmienne w grupie pacjentów hemodializowanych. Stąd można założyć, że miażdżycy u chorych CKD1–2 i CVD nie różni się, z kolei miażdżycy w CKD ma już wiele cech „typowo nerkowej” miażdżycy. Obecnie w ramach innego projektu (grant NCN, konkurs Opus 3), w którym autorka rozprawy pełni rolę głównego wykonawcy, kontynuowane są badania w tym zakresie przy użyciu najnowocześniejszych narzędzi badawczych.

*Stworzenie modeli stresu oksydacyjnego i dysfunkcji śródbłonna naczyniowego przy użyciu sieci Petriego*

Dla celów projektu stworzono dwa modele przy użyciu sieci Petriego. Jeden model przedstawia stres oksydacyjny i zjawiska mu towarzyszące. Natomiast tematem drugiego modelu była dysfunkcja śródbłonna.

Celem tego zadania było usystematyzowanie wiedzy w zakresie poruszanych tematów i stworzenie modeli, które w najwierniejszy sposób odzwierciedlałyby opisywaną rzeczywistość.

Na podstawie przeprowadzonej analizy własności tych modeli ukazano, że procesy zapalne, immunologiczne i stres oksydacyjny, wraz z zaburzeniami lipidowymi współistnieją bardzo często ze sobą i właściwie wszystkie są niezbędne dla powstania i rozwoju miażdżycy.

Epidemia chorób układu sercowo-naczyniowego stała się jednym z najistotniejszych wyzwań przed jakimi stanęła medycyna XX i początku XXI wieku. W zakrojonych na szeroką skalę badaniach klinicznych, poczynając od Framingham Heart Study, ustalono główne czynniki zwiększające zagrożenie chorobami

układu krążenia, w szczególności chorobą wieńcową, które nazwano czynnikami ryzyka choroby wieńcowej (tzw. klasyczne czynniki ryzyka).

Nie ulega wątpliwości, że chorzy z przewlekłą chorobą nerek są obciążeni zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym. Jednak obserwacje i badania przeprowadzone w grupie chorych z PChN, szczególnie chorych dializowanych, wskazują na słabą lub zaburzoną zależność pomiędzy ryzykiem choroby wieńcowej a wybranymi klasycznymi czynnikami ryzyka.

Wydaje się, że wraz z pogłębianiem się niewydolności nerek relacje pomiędzy klasycznymi czynnikami ryzyka a nowymi (czynniki zapalne, homocysteinemia, zespół metaboliczny) oraz czynnikami ryzyka związanymi z chorobą nerek (hipoalbuminemia, niedożywienie, mikroalbuminuria, niedokrwistość, zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej, zwapnienia naczyń w błonie środkowej (u chorych hemodializowanych, wzrost sił ścinania (ang. shear stress) [143])) oraz predyspozycjami genetycznymi zmieniają się. Który z nich jest ważniejszy? Wydaje się, że mniej więcej do 4 stadium PChN zależności pomiędzy poszczególnymi czynnikami a ryzykiem, jakiego są przyczyną pozostają zachowane. Relacje te ulegają natomiast wyraźnej zmianie w 5. stadium PChN, gdzie współlistnieją procesy zapalne, stres oksydacyjny, zaburzenia lipidowe charakterystyczne dla mocznicy, niedokrwistość i zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej. Niewydolność nerek poprzez szereg odrębności, które jej towarzyszą, łącznie z aktywacją układu renina-angiotensyna-aldosteron, zwapnieniami w błonie środkowej naczyń, nadkrzepliwością, której sprzyjają podwyższone stężenie fibrynogenu i inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu, dodatkowo sprzyja rozwojowi miażdżycy. Sama złożoność miażdżycy w złożonej zaawansowanej chorobie nerek powoduje, że wydaje się, że powinno się ją traktować odrębnie, tj. nie jako klasyczną miażdżycę, lecz jako miażdżycę towarzyszącą zaawansowanej chorobie nerek.

## 8. Wnioski

1. Wraz z narastaniem stopnia upośledzenia funkcji nerek dochodzi do nasilenia procesów zapalno-immunologicznych i oksydacyjnych, co widać szczególnie wyraźnie w grupie chorych leczonych hemodializą.
2. Chorzy w początkowych stadiach przewlekłej choroby nerek mają poziomy stresu oksydacyjnego i procesów zapalnych zbliżone do tych obserwowanych wśród pacjentów z ostrym incydem wieńcowym w wywiadzie, lecz bez jawnej klinicznie i laboratoryjnie choroby nerek.
3. Neopteryna, interleukina 18, asymetryczna dimetyloarginina, paraoksonaza 1 oraz wskaźnik metaloproteinaza 9/tkankowy inhibitor metaloproteinaz 1, mogą być wykorzystane do oszacowania prawdopodobieństwa 12-miesięcznego przeżycia wśród pacjentów hemodializowanych.
4. Różnica we względnej akumulacji alfa-1 mikroglobuliny, apolipoproteiny A-IV, fibrynogenu i haptoglobiny zaobserwowana zarówno w proteomie chorych z przewlekłą chorobą nerek, jak i chorych z incydem wieńcowym w wywiadzie, lecz bez jawnej klinicznie i laboratoryjnie choroby nerek, świadczy o szczególnej roli tych białek w procesie miażdżycy.
5. Alfa-1 mikroglobulina i apolipoproteina A-IV mogą służyć do różnicowania proteomów pacjentów z przewlekłą chorobą nerek oraz chorych z ostrym incydem wieńcowym w wywiadzie, lecz bez jawnej klinicznie i laboratoryjnie choroby nerek.
6. Zaproponowane, oparte na sieciach Petriego, modele dysfunkcji śródbłonna naczyniowego oraz stresu oksydacyjnego w procesie powstawania miażdżycy, mogą w przyszłości posłużyć do precyzyjnego badania tych zaburzeń w organizmie człowieka.

## 9. Streszczenie

Miażdżyca to złożony proces zapalno-fibroproliferacyjny toczący się w błonie wewnętrznej dużych i średnich naczyń tętniczych, w którym współwystępują obok siebie zaburzenia lipidowe, stan zapalny oraz stres oksydacyjny. Sytuacja staje się jeszcze bardziej złożona, gdy obok tzw. „klasycznej” miażdżycy i tradycyjnych czynników ryzyka pojawi się złożona choroba, jaką jest przewlekła choroba nerek (PChN). Różnorodność zjawisk, do których dochodzi w trakcie tworzenia blaszki miażdżycowej jest tak duża, że uwzględnienie całej złożoności analizowanego zagadnienia może wymagać zupełnie nowego podejścia. W rozprawie zastosowano dwa podejścia, jedno klasyczne (kliniczne) i drugie systemowe.

Głównym celem badawczym rozprawy była analiza molekularnych podstaw powstawania miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek. Drugim celem było stworzenie, w oparciu o sieci Petriego, modeli dysfunkcji śródbłonna i stresu oksydacyjnego w miażdżycy.

Klasyczne podejście było realizowane w oparciu o analizę zmian obserwowanych u 75 osób z różnym stopniem zaawansowania PChN podzielonych na trzy równoliczne grupy (CKD1-2, CKD3-4, CKD5 (chorzy hemodializowani)) oraz 25 pacjentów z ostrym zespołem w wywiadzie, lecz bez choroby nerek (grupa CVD). Grupę porównawczą utworzyło 25 zdrowych ochotników (grupa HV). Głównym kryterium wykluczenia z badania była cukrzyca. Osoby były dobrane do grup w taki sposób, aby nie różniły się istotnie pomiędzy sobą wiekiem, płcią oraz przyjmowanymi lekami. Wszyscy badani byli następnie przez rok monitorowani pod względem wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego zakończonego zgonem.

W badaniu wykonano następujące rodzaje analiz: badania laboratoryjne – głównie przy użyciu metody ELISA (zbadane parametry: a) markery procesów zapalnych: neopteryna, IL-18, hsCRP, b) wskaźniki stresu oksydacyjnego (MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1, ADMA, MPO, PON-1) oraz c) NT-proBNP jako marker ryzyka sercowo-naczyniowego), badania proteomiczne (dwukierunkowe (dwuwymiarowe) rozdziały elektroforetyczne, połączone z analizą spektrometryczną), ocenę grubości kompleksu intima-media tętnic szyjnych – IMT (za pomocą USG), badania systemowe (sieci Petriego). Ponadto w każdej z grup wykonano podstawowe badania laboratoryjne w celu ich scharakteryzowania.

Zaobserwowano, że w miarę narastania upośledzenia funkcji nerek wzrastają stężenia neopteryny, IL-18, ADMA, MPO, NT-proBNP oraz wielkość wskaźnika MMP-9/TIMP-1 i IMT, czemu towarzyszy obniżone stężenie PON-1 w surowicy krwi. Analiza proteomów chorych z grup CKD i CVD ujawniła różnice w zakresie czterech białek:  $\alpha$ -1 mikroglobuliny, apo A-IV, haptoglobiny i fibrynogenu.

Z kolei analiza krzywych przeżycia pozwoliła na wskazanie kilku parametrów, tj. neopteryny, IL-18, ADMA, PON-1 oraz wskaźnika MMP-9/TIMP-1, które mogą być wykorzystane do oszacowania 12-miesięcznego przeżycia wśród pacjentów hemodializowanych.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że miażdżycy w PChN w początkowych stadiach jest podobna do tzw. „klasycznej” miażdżycy. Natomiast złożoność miażdżycy w zaawansowanej chorobie nerek powoduje, że należy ją traktować odrębnie, czyli jako miażdżycę towarzyszącą schyłkowej niewydolności nerek. Zaproponowane modele wybranych procesów, oparte o sieci Petriego, mogą w przyszłości posłużyć do precyzyjnej analizy zaburzeń towarzyszących miażdżycy.

## 10. Summary

Atherosclerosis is a complex inflammatory-fibroproliferative process in the intima of large and medium-sized arteries, which is accompanied by lipids disorders, inflammation and oxidative stress. The situation becomes even more complex when the so-called "classical" atherosclerosis and traditional risk factors coexist with so complex disease, such as chronic kidney disease (CKD). A variety of phenomena that occur during the development of atherosclerotic plaque is so large that taking into account the complexity of the analyzed issue may require a completely new approach. In this study two approaches, have been applied. One of them is the classical (clinical) approach and the second is the systems one.

The main objective of the research has been to analyze the molecular basis of the atherosclerosis in patients with CKD. The second goal of the study has been to create the Petri nets based models of an endothelial dysfunction and an oxidative stress in atherosclerosis.

The classical approach has been carried out on the basis of analysis of the changes observed in 75 patients with varying severity of CKD, divided into three equal groups (CKD1-2 CKD3-4 CKD5 (hemodialysis patients)) and 25 patients with incident acute coronary syndrome in the past, but without kidney disease (CVD group.) The control group consisted of 25 healthy volunteers (HV group). Primary criterion for exclusion was diabetes mellitus. All subjects have been matched to the groups in a way to do not differ significantly from each other in terms of age, sex, and drugs administered. All patients have been followed for one year monitored for the occurrence of cardiovascular events complicated by death.

In this study the following types of the tests have been done, i.e. laboratory tests – mainly performed by ELISA (examined parameters: a) markers of inflammation: neopterin, IL-18, hsCRP, b) indices of oxidative stress (MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1, ADMA, MPO, PON-1) and c) NT-proBNP as a marker of cardiovascular risk), proteomic studies (bi-directional, (two-dimensional) electrophoresis combined by spectrometric analysis), the assessment of the of the carotid intima-media thickness – IMT (using USG) and the systemic approach (Petri nets). In addition, in each group basic laboratory tests for their characteristics have been performed.

In the study it has been observed that, an increase in serum concentration of neopterin, IL-18, ADMA, MPO, NT-proBNP, and the MMP-9/TIMP-1 ratio and IMT and a decrease in PON-1 serum concentration have been accompanied by the kidney function decline. Proteome analyses in patients with CKD and CVD groups have revealed differences in the four proteins:  $\alpha$ -1 microglobulin, apo A-IV, haptoglobin and fibrinogen. The analysis of the survival curves allowed

the indication of several parameters, such as: neopterin, IL-18, ADMA, PON-1 and MMP-9/TIMP-1 ratio which can be used to estimate 12-months survival of hemodialysed patients.

Based on the obtained results it can be concluded that atherosclerosis in the early stages of CKD is similar to the so-called “classical atherosclerosis”. However, the complexity of atherosclerosis in the advanced kidney disease entails, that it should be treated separately, i.e. as an atherosclerosis associated with end-stage renal disease. The proposed models of the selected processes based on Petri nets, in future may be used for the precise analyses of the disturbances associated with atherosclerosis.



## 11. Piśmiennictwo

1. Ajuebor M.N., Flower R.J., Hannon R., Christie M., Bowers K., Verity A., Perretti M.: Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. *J. Leukoc. Biol.*, 1998; 63: 108–116.
2. Åkerström B., Lögdeberg L., Berggård T., Osmark P., Lindqvist A.: Alpha-1 mikroglobulin: a yellow-brown lipocalin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2000; 1482: 172–184.
3. Albani S., Carson D.A.: A multistep molecular mimicry hypothesis for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunol. Today*, 1996; 17: 466–470.
4. Almanzar G., Öllinger R., Leuenberger J., Onestingel E., Rantner B., Zehm S., Cardini B., van der Zee R., Grundtman C., Wick G.: Autoreactive HSP60 epitope-specific T-cells in early human atherosclerotic lesions. *J. Autoimmunity*, 2012; 39: 441–450.
5. Anitschkow N., Chalataw S.: Ueber experimentelle Cholesterinsteatose und ihre Bedeutung fuer die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Zentrbl. Allg. Pathol. u. Pathol. Anat.* 1913; 24: 1–9.
6. Arici M., Walls J.: End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: is C-reactive protein the missing link? *Kidney Int.* 2001; 59: 407–14.
7. Auer J., Berent R., Labetanig E., Eber B.: Serum neopterin and activity of coronary artery disease. *Heart. Dis.* 2001; 3: 297–301.
8. Ayada K., Yokota K., Kobayashi K., Shoenfeld Y., Matsuura E., Oguma K.: Chronic infections and atherosclerosis. *Clinic. Rev. Allerg. Immunol.*, 2009; 37: 44–48.
9. Baccarelli A., Rienstra M., Benjamin E.J.: Cardiovascular epigenetics: basic concepts and results from animal and human studies. *Circ. Cardiovasc. Genet.*, 2010; 3: 567–573.
10. Bae Y.S., Lee J.H., Choi S.H., Kim S., Almazan F., Witztum J.L., Miller Y.I.: Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circ. Res.* 2009; 104: 210–218.
11. Baigent C., Landray M.J., Reith C., Emberson J., Wheeler D., Tomson C., i wsp.: The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, 2011; 377: 2181–2192.
12. Balamuthusamy S., Srinivasan L., Verma M., Adigopula S., Jalandhara N., Hathiwala S., Smith E.: Renin angiotensin system blockade and cardiovascular outcomes in patients with chronic kidney disease and proteinuria: a meta-analysis. *Am. Heart J.*, 2008; 155: 791–805.
13. Baldan P., Cocco N., Marin A., Simeoni M.: Petri nets for modelling metabolic pathways: a survey. *Nat. Comput.*, 2010; 9: 955–989.
14. Baldassarre D, Porta B, Camera M, Amato M, Arquati M, Brusoni B, Fiorentini C, Montorsi P, Romano S, Veglia F, Cortellaro M, MIAMI Study Group. Markers of

- inflammation, thrombosis and endothelial activation correlate with carotid IMT regression in stable coronary disease after atorvastatin treatment. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2009;19:481–90.
15. Ballestar E.: An introduction to epigenetics. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2011; 711: 1–11.
  16. Banchereau J., Briere F., Caux Ch., Davoust J., Lebecque S., Liu Y–J., Pulendran B., Palucka K.: Immunobiology of dendritic cells. *Ann. Rev. Immunol.*, 2000; 18: 767–811.
  17. Beck S., Rakyán V.K.: The methylome: approaches for global DNA methylation profiling. *Trends. Genet.*, 2008; 24: 231–237.
  18. Bedford M.T.: Arginine methylation at glance. *J. Cell. Sci.*, 2007; 120: 4243–4246.
  19. Bednarski R., Marcinkowska E., Stóżecki P., Manitius J., Korenkiewicz J., Marszałek A.: Nefropatia nadciśnieniowa – opis przypadku. *Choroby Serca i Naczyń*, 2008; 5: 159–165.
  20. Benagiano M., Azzurri A., Ciervo A., Amedei A., Tamburini C., Ferrari M., Telford J.L., Baldari C.T., Romagnani S., Cassone A., D'Elisio M.M., Del Prete G.: T helper type 1 lymphocytes drive inflammation in human atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2003; 100: 6658–6663.
  21. Benditt E.P., Benditt J.M.: Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1973; 70: 1753–1756.
  22. Beręsewicz A.: Miażdżycza i choroba niedokrwienna serca z lotu ptaka. [W:] Beręsewicz A. [red.] *Patofizjologia miażdżycy i choroby niedokrwiennej serca*. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa 2011.
  23. Berek K., Bobiński R.: Miażdżycza – choroba wieloczynnikowa. *Probl. Pielęg.*, 2009; 17: 257–262.
  24. Berg K.: A new serum type system in man – the Lp system. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1963; 59: 369–82.
  25. Berliner J., Nayab A.M., Fogelman A.M., Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A., Watson A.D., Lusis A.J.: Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. *Circulation*, 1995; 91: 2488–2496.
  26. Bezeley J., Bieber B., Li Y., Morgenstern H., de Sequera P., Combe C., Yamamoto H., Gallagher M.P., Port F.K., Robinson B.M.: C-reactive protein and prediction of 1-year mortality in prevalent hemodialysis patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephro.*, 2011; 6: 2452–2461.
  27. Binder C.J., Chang M.K., Shaw P.X., Miller Y.I., Hartvigsen K., Dewan A., Witztum J.L.: Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat. Med.*, 2002; 8: 1218–1226.
  28. Blankenberg S., Tiret L., Bickel C., Peetz D., Cambien F., Meyer J., Rupprecht H.J.: Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation*, 2002; 106: 24–30.
  29. Blum A., Peleg A., Weinberg M.: Anti-cytomegalovirus (CMV) IgG antibody titer in patients with risk factors to atherosclerosis. *Clin. Exp. Med.*, 2003; 3: 157–160.
  30. Błażewicz J., Formanowicz D., Formanowicz P.: Zastosowanie sieci Petriego do modelowania procesów biologicznych. *Kosmos*, 2009; 58: 79–88.
  31. Bonifer C., Cockerill P.N.: Chromatin mechanisms regulating gene expression in health and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2011; 711: 12–25.

32. Boucher J.L., Moali C., Tenu J.P.: Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999, 55, 1015–1528.
33. Bradley A., Evans M., Kaufman M.H., Robertson E.: Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 1984; 309: 255–256.
34. Brown M.S., Goldstein J.L.: Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 1983; 52: 223–261.
35. Brown M.S., Goldstein J.L.: A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 1986; 232: 34–47.
36. Burchardt P., Żurawski J., Kubacki T., Wysocki H.: Czy regresja zmian miażdżycowych jest możliwa tylko przez obniżanie stężenia LDL i czy jest to działanie wystarczające by zredukować skłonność tych lipoprotein do oksydacyjnej modyfikacji? *Kard. Pol.*, 2011; 69: 834–837.
37. Burke J.F., Jr Francos G.C., Moore L. L., Cho S. Y., Lasker N.: Accelerated atherosclerosis in chronic-dialysis patients – another look. *Nephron*, 1978; 21: 181–185.
38. Burns A.: Observations on some of the most frequent and important diseases of the heart; an aneurysm of the thoracic aorta; on preternatural pulsation in the epigastric region; and on the unusual origin and distribution of some of the large arteries in the human body. Edinburgh, UK, Bryce: 1809.
39. Calinski T., Harabasz J.: A dendrite method for cluster analysis. *Communications in Statistics – Theory and Methods*, 1974; 3: 1–27.
40. Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P.: Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 2004; 25: 1327–1333.
41. Charlton-Menys V., Durrington P.N.: Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp. Physiol.*, 2008; 93: 27–42.
42. Carrero J.J., Stenvinkel P.: Inflammation in end-stage renal disease – what have we learned in 10 years? *Semin. Dialysis.*, 2010; 23: 498–409.
43. Chen K.C., Wang Y.S, Hu C.Y, Chang W.C., Liao Y.C., Dai C.Y., Juo S.H.: OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases. *FASEB J.*, 2011; 25: 1718–1728.
44. Chiang C.K., Hsu S.P, Pai M.F, Peng Y.S., Ho T.I., Liu S.H., Hung K.Y., Tsai T.J.: Interleukin-18 is a strong predictor of hospitalization in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2004; 19: 2810–2815.
45. Chong L., Ray L.B.: Whole-istic biology. *Science*. 2002; 295: 1661.
46. Choussat R., Montalescot G., Collet J., Jardel C., Ankiri A., Fillet A., Thomas D., Raymond J., Bastrd J., Drobinski G., Orfila J., Agut H., Tomas D.: Effect of prior exposure to Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, or Cytomegalovirus on the degree of inflammation and one-year prognosis of patients with unstable angina pectoris or non-Q-wave acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, 2000; 15: 379–384.
47. Chrzanowski Ł.: Reakcja zapalna i potencjalne czynniki zakaźne w patogenezie oraz w obrazie klinicznym miażdżycy. *Pol. Przegl. Kardiol.*, 2001; 3, 2, 159–161.

48. Cole J.E., Georgiou E., Monaco C.: The expression and function of Toll-like receptors in atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, 2010, article ID 393946.
49. Cominacini L., Rigoni A., Pasini A.F., Garbin U., Davoli A., Campagnola M., Pastorino A.M., Lo Cascio V., Sawamura T.: The binding of oxidized low density lipoprotein [ox-LDL] to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 13750–13755.
50. Coresh J., Longenecker J.C., Miller E.R., Young H.J., Klag M.J.: Epidemiology of cardiovascular risk factors in chronic renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, (Suppl 1) 1998; 9: 24–30.
51. Creemers E.E., Cleutjens J.P., Smits J.F., Daemen.: Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ. Res.*, 2001; 89: 201–210.
52. Czekalski S., Pawlaczyk K.: Nefropatia nadciśnieniowa czy nefropatia miażdżycowa? [W:] Czekalski S., Rutkowski B. (red.) Nefropatia nadciśnieniowa. Termedia Wydawnictwo Medyczne, Poznań 2007.
53. Danesh J., Whincup P., Walker M., Lennon L., Thomson A., Apleby P., Wong Y., Bernardes-Silva M., Ward M.: Chlamydia pneumoniae IgG titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *BMJ.*, 2000; 321: 201–213.
54. Daugherty A., Hansson G.K.: Lymphocytes in atherogenesis, [W:] Dean R.T and Kelly D. (red.) Atherosclerosis, Oxford Press, New York, 2000.
55. Daugherty A., Rateri D.L.: T lymphocytes in atherosclerosis. The Yin-Yang of Th1 and Th2 influence on lesion formation. *Circ. Res.*, 2002; 90: 1039–1040.
56. Davies P.F., Reidy M.A., Goode T.B., Bowyer D.E.: Scanning electron microscopy in the evaluation of endothelial integrity of the fatty lesion in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1976; 25: 125–130.
57. Davignon J., Ganz T.: Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 2004; 109 (Suppl 1): 27–32.
58. de Haro Miralles J., Martinez-Aguilar E., Florez A., Varela C., Bleda S., Acin F.: Nitric oxide: link between endothelial dysfunction and inflammation in patients with peripheral arterial disease of the lower limbs. *Interact. CardioVasc. Thorac. Surg.*, 2009; 9: 107–112.
59. de Maio A.: Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones*, 2011; 16: 235–249.
60. Degoulet P., Legrain M., Rèach I., Aimè F., Devriès C., Rojas P., Jacobs C.: Mortality risk factors in patients treated by chronic hemodialysis. Report of the Diaphane collaborative study. *Nephron*, 1982; 31: 103–110.
61. Deshmane S.L., Kremlev S., Amini S., Sawaya B.E.: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2009; 19: 313–326.

62. de Winther M.P.J., van Dijk K.W., Havekes L.M., Hofker M.H.: Macrophage scavenger receptor class A: a multifunctional receptor in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000; 20: 290–297.
63. Dmitrzak-Węglarz M., Hauser J.: Wykorzystanie badań proteomicznych w poszukiwaniu markerów biologicznych dla chorób psychicznych. *Psychiatria*, 2006; 3: 118–127.
64. Doroszko A., Andrzejak R., Szuba A.: Dysfunkcja śródbłonna i ADMA w patogenezie nadciśnienia tętniczego. *Arterial Hypertension.*, 2008, 12: 224–237.
65. Drüeke T.B., Massy Z.A.: Atherosclerosis in CKD: differences from the general population. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2010; 6: 723–735.
66. Dudziak M., Deeg P., Raczak G.: Wpływ procesu zapalnego na zmiany w układzie krążenia u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek. *Kardiol. Pol.*, 67; supl.6.: 426–430.
67. Dursun E., Monari E., Cuoghi A., Bergamini S., Ozben B., Suleymanlar G., Tomasi A., Ozben T.: Proteomics profiling during atherosclerosis progression using SELDI-TOF-MS: Effect of darbepoetin treatment. *Acta Histochem.*, 2010; 112: 432–443.
68. Elhage R., Jawien J., Rudling M., Ljunggren H.G., Takeda K., Akira S., Bayard F., Hansson G.K.: Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc. Res.*, 2003; 59: 234–240.
69. ESRD Patients in 2009. A Global Perspective. Fresenius Medical Care, Bad Homburg 2009.
70. Evans M.J., Kaufman M.H.: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981: 292; 154–156.
71. Felström B.C., Jardine A.G., Schmieder R.E., Holdaas H., Bannister K., Bautler J., i wsp. for the AURORA Study Group.: Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis. *N. Engl. J. Med.*, 2009; 360: 1395–1407.
72. Fleishmann E.H., Bower J.D., Salahudeen A.K.: Risk factor paradox in hemodialysis: Better nutrition as partial explanation. *ASAIO J.*, 2001; 38: 1343–1350.
73. Foltyn W., Kos-Kudła B., Siemińska L., Strzelczyk J., Kajdaniuk D., Marek B.: Osteoporosis and atherosclerosis – common etiopathogenesis? *Pol. J. Endocrinol.*, 2003; 54: 316–320.
74. Formanowicz D.: Do changes in iron metabolism contribute to the acceleration of the atherosclerosis process? *BioTechnologia*, 2011; 92: 180–192.
75. Formanowicz D.: Neopterin in patients with chronic kidney disease and patients with coronary artery disease. *BioTechnologia*, 2012; 93: 59–67.
76. Formanowicz D., Kozak A., Formanowicz P.: Selected aspects of endothelial dysfunction and their influence on the atherosclerosis process modeled and analyzed by Petri net based approach. *BioTechnologia*, 2011; 92: 359–368.
77. Formanowicz D., Kozak A., Formanowicz P.: A Petri net based model of oxidative stress in atherosclerosis. *Found. Comput. Dec. Sci.*, 2012; 37: 60–78.
78. Formanowicz D., Sackmann A., Formanowicz P., Błazewicz J.: Petri net based model of the body iron homeostasis. *J. Biomed. Inform.*, 2007; 40: 476–485.

79. Formanowicz D., Sackmann A., Kozak A., Błażewicz J., Formanowicz P.: Some aspects of the anemia of chronic disease modeled and analyzed by Petri net based approach. *Bioproc. Biosyst. Eng.*, 2011; 34: 581–595.
80. Fridovich I.: Superoxide dismutase: studies of structure and mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1976; 74: 530–539.
81. Fried L.F., Shlipak M.G., Crump C., Bleyer A.J., Gottdiener J.S., Kronmal R.A., Kuller L.H., Newman A.B.: Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and mortality in elderly individuals. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2003; 41: 1364–1372.
82. Fredrikson G.N., Soderberg I., Lindholm M., Dimayuaga P., Chyu K.Y., Shah P.K., Nilsson J.: Inhibition of atherosclerosis in apoE null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003; 23: 879–884.
83. Fuster V., Moreno P.R., Fayad Z.A., Corti R., Badimon J.J. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2005; 46: 937–954.
84. Galkina E., Ley K.: Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Ann. Rev. Immunol.* 2009; 27: 165–197.
85. Galus R., Zandecki Ł., Joźwiak J., Włodarski K.: Pozalipidowe działanie statyn. *Pol. Merk. Lek.*, 2008; 144: 545–548.
86. Ganda O.P., Arkin C.F.: Hyperfibrinogenemia. An important risk factor for vascular complications in diabetes. *Diabetes Care.*, 1992; 15: 1245–1250.
87. Gangemi S, Mallamace A, Minciullo PL, Santoro D, Merendino RA, Savica V, Bellinghieri G. Involvement of interleukin-18 in patients on maintenance haemodialysis. *Am. J. Nephrol.*, 2002; 22: 417–421.
88. Girndt M, Sester U, Kaul H, Kohler H. Production of proinflammatory and regulatory monokines in hemodialysis patients shown at a single-cell level. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1998; 9: 1689–1696.
89. Glass C.K., Witztum J.L.: Atherosclerosis the road ahead. *Cell*, 2001;104: 503–516.
90. Go A.S, Chertow G.M., Fan D., McCulloch C.E., Hsu C.Y.: Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 351: 1296–305.
91. Goldstein J.L., Brown M.S.: The Cholesterol Quartet. *Science*, 2001; 292: 1310–1312.
92. Goldstein J.L., Brown M.S.: History of Discovery: The LDL Receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2009; 29:431–438.
93. Gotch F.A., Sargent J.A.: A mechanistic analysis of the National Cooperative Dialysis Study (NCDS). *Kidney Int.*, 1985; 28: 526–534.
94. Goyal T., Mitra S., Khaidakov M., Wang X., Singla S., Ding Z.: Current concepts of the role of oxidized LDL receptors in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.*, 2012; 14: 150–159.
95. Grafahrend-Belau E., Schreiber F., Heiner M., Sackmann A., Junker B.H., Grunwald S., Speer A., Winder K., Koch I.: Modularization of biochemical networks based on classification of Petri net t-invariants. *BMC Bioinform.*, 2008; 9: 90.
96. Grammer T.B., Fuchs D., Boehm B.O., Winkelmann B.R., Maerz W.: Neopterin as a predictor of total and cardiovascular mortality in individuals undergoing angiog-

- raphy in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Clin. Chem.*, 2009; 55: 1135–1146.
97. Grant S.G.N.: Systems biology in neuroscience: bridging genes to cognition. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2003; 13: 577–582.
  98. Greaves D.R. Gordon S.: Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *J. Lipid. Res.*, 2005; 46, 11–20.
  99. Gross P., Schirutschke H., Barnett K.: Czy każdemu pacjentowi z zaawansowaną przewlekłą chorobą nerek powinniśmy przepisywać leki hipotensyjne? Komentarz do dwóch ostatnich metaanaliz. *Med. Prakt.*, 2009; 10: 25–30.
  100. Grundtman C., Kreutmayer S.B., Almanzar G., Wick M.C., Wick G.: Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011; 31: 960–968.
  101. Grundtman C., Wick G.: The autoimmune concept of atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2011; 22: 327–334.
  102. Grykiel-Górniak B.: Stres oksydacyjny jako czynnik ryzyka kardio-diabetologicznego – fakty i mity. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2010; 2: 109–117.
  103. Grygorowicz M.A., Kozłowska E.: Udział receptorów TLR rozpoznających wzorce molekularne organizmów patogennych w modulowaniu aktywności regulatorowych limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXPP3<sup>+</sup>. *Post. Mikrobiol.*, 2011; 50: 141–154.
  104. Gupta S., Pablo A.M., Jiang X., Wang N., Tall A.R., Schindler C.: IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J. Clin. Invest.*, 1997; 99: 2752–2761.
  105. Haberstroh U., Stilo K., Pocock J., Wolf G., Helmchen U., Wenzel U., Zahner G., Stahl R.A., Thaiss F.: L-arginine suppresses lipopolysaccharide-induced expression of RANTES in glomeruli. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1998; 9: 203–210.
  106. Han J., Kamber M.: *Data Mining: Concepts and Techniques – 2<sup>nd</sup> edition*, Morgan and Kaufmann Publishers, San Francisco, 2006.
  107. Hansson J., Vasan R.S. Ärnlov J., Ingelsson E., Lind L., Larsson A., Michälsson K., Sundström J.: Biomarkers of extracellular matrix metabolism (MMP-9 and TIMP-1) and risk of stroke, myocardial infarction and cause-specific mortality: Cohort Study. *PLOS One.*, 2011; 6: e16185.
  108. Hansson G.K.: Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2001; 21: 1876–1890.
  109. Hansson G.K.: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 352: 1685–1695.
  110. Hansson G.K., Libby P., Schonbeck U., Yan Z.Q.: Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ. Res.*, 2002; 91: 281–291.
  111. Hansson G.K., Libby P.: The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Rev. Immunol.*, 2006; 6: 508–519.
  112. Hardy S., Robillard P.N.: Modeling and simulation of molecular biology systems using Petri nets: modeling goals of various approaches. *J. Bioinform. Comput. Biol.*, 2004; 2: 619–637.

113. Heerspink H.J., Ninomiya T., Zoungas S., de Zeeuw D., Grobbee D.E., Jardine M.J., Gallagher M., Roberts M.A., Cass A., Neal B., Perkovic V.: Effect of lowering blood pressure on cardiovascular events and mortality in patients on dialysis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Lancet*, 2009; 373: 1009–1105.
114. Heiner M., Gilbert D., Donaldson R.: Petri nets for systems and synthetic biology. W: Bernard M., Degano P., Zavattaro G (red.) *Proc. of SFM 2008, Lect. Notes Comp. Sci.*, 5016, Springer Verlag, Berlin, 2008.
115. Heiner M., Herajy M., Liu F., Rohr C., Schwarick M.: Snoopy – a unifying Petri net tool. *Lect. Notes Comp. Sci.*, 2012; 7347: 398–407.
116. Heiner M., Koch I., Willy J.: Model validation of biological pathways using Petri nets – demonstrated for apoptosis. *Biosystems* 2004; 73: 15–21.
117. Heiner M., Richter R., Schwarick M.: Snoopy – a tool to design and animate/simulate graph-based formalisms. *Proc. PNTAP, ACM, New York*, 2008.
118. Hirashiki A., Yamada Y., Murase Y., Suzuki Y., Kataoka H., Morimoto Y., Tajika T., Murohara T., Yokota M.: Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in low- or high-risk subjects defined by conventional risk factors. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2003; 42(8): 1429–1437.
119. Hodis H.N., Mack W.J., LaBree L., Selzer R.H., Liu C-R., Azen S.P.: The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann. Intern. Med.*, 1998; 128: 262–269.
120. Hofestädt R.: A Petri net application of metabolic processes. *J. Syst. Anal. Model. Simulat.*, 1994; 16: 113–122.
121. Hunt B.J., Jurd K.M. Endothelial cell activation. A central pathophysiological process. *BMJ.*, 1998; 316: 1328–1329.
122. Ignaro L.J.: Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB. J.*, 1989; 3: 31–36.
123. Ignatowski A.I.: Ueber die Wirkung der tierschen Einweisse auf der Aorta. *Virchow's Arch. Pathol. Anat.*, 1909; 198: 248.
124. Imiela J., Filipiak K.J., Małecki R.: Hemodializa a choroby układu sercowo-naczyniowego [W:] Pasierski T., Myśliwiec M., Imiela J. [red.] *Kardionefrologia. Medical Tribune Polska, Warszawa*, 2006.
125. Ishida T., Takahashi M., Coron M.A., Berk B.C.: Fluid shear stress-mediated signal transduction: how do endothelial cells transduce mechanical force into biological responses? *Ann. NY Acad. Sci.*, 1997; 811: 12–24.
126. Isikawa K., Navab M., Leitinger N., Fogelman A.M., Lusis A.J.: Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *J. Clin. Invest.*, 1997; 100: 1209–1216.
127. Itabe H., Mori M., Fujimoto Y., Higashi Y., Takano T.: Minimally modified LDL is an oxidized LDL enriched with oxidized phosphatidylcholines. *J. Biochem.* 2003; 134, 459–465.
128. Jakubowski H.: Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J.*, 1999; 13: 2277–2283.



129. Jakubowski H.: Translational accuracy of aminoacyl-tRNA synthetases: implications for atherosclerosis. *J. Nutr.*, 2001; 131: 2983S–2987S.
130. Jakubowski H., Zhang L., Bardeguet A., Aviv A.: Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. *Circ. Res.*, 2000; 87: 45–51.
131. Janciauskiene S., Welete T., Mahadeva R.: Acute Phase Proteins: Structure and Function Relationship. [W]: Acute Phase Proteins – Regulation and functions of acute phase proteins. Veas F. (ed) 2011, InTech, dostęp <http://www.intechopen.com/books/acute-phase-proteins-regulation-and-functions-of-acute-phase-proteins/acute-phase-proteins-structure-and-function-relationship>
132. Jawień J.: Nowe, immunologiczne spojrzenie na patogenezę miażdżycy. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2008; 118: 127–131.
133. Jawień J.: Mouse experimental models of atherosclerosis in pharmacology. *J. Clinic. Experiment. Cardiol.*, 2011, S:1 <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9880.S1-001>.
134. Jawień J., Jawień M.: Patophysiology of atherosclerosis based on research in apoE-knockout mice and their usefulness in checking new atherosclerotic agents. *Acta Angiol.*, 2009, 15: 1–9.
135. Jonasson L., Holm J., Skalli O., Bondjers G., Hansson G.: Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 1986; 6: 131–138.
136. Jurkowitz C.T., Abramson J.L., Vaccariono L.V., Weintraub W.S., McClellan W.M.: Association of high serum creatinine and anemia increases the risk of coronary events: results from the prospective community-based atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2003; 14: 2919–2925.
137. Kalantar-Zadeh K., Block G., Humphreys M.H., Kopple J. D.: Reverse epidemiology of cardiovascular risk factors in maintenance dialysis patients. *Kidney Int.*, 2003; 63: 793–808.
138. Kalantar-Zadeh K., Block G., Horwich T., Fonarow G.C.: Reverse epidemiology of conventional cardiovascular risk factors in patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2004; 43: 1439–1444.
139. Kalantar-Zadeh K., Kopple J.D.: Relative contributions of nutrition and inflammation to clinical outcome in dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.*, 2001; 38: 1343–1350.
140. Karpus W.J., Lukacs N.W., Kennedy K.J., Smith W.H., Hurst S.D., Barrett T.A.: Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J. Immunol.* 1997; 158: 4129–4136.
141. Kawahara Y., Yokota K., Mizuno M., Yunoki N., Uesu T., Okada H., Kobayashi K., Hirai Y., Oguma K., Tsuji T.: Antibodies to human gastric epithelial cells and heat shock protein 60 in *Helicobacter pylori* positive mucosa associated lymphoid tissue lymphoma. *Gut*, 1999; 45: 20–23.
142. Kaźmierski R.: Biomechaniczne siły ścinania występujące w tętnicach szyjnych a rozwój miażdżycy. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2003; 57: 713–725.

143. Kaźmierski R.: Udział czynników zapalnych i zakaźnych w patogenezie miażdżycy tętnic szyjnych. *Pol. Prz. Neurol.* 2009; 5: 166–176.
144. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements* 2013; 3.
145. Kessler M., Canaud B., Pedrini L.A. i wsp. European best practice guidelines for hemodialysis (part 1). Section II. Hemodialysis adequacy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002; 17: 17–31.
146. Kibbe M., Billiar T., Tzeng E.: Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovasc. Res.*, 1999; 43: 650–657.
147. Kiechl S., Lorenz E., Reindl M., Wiedermann C.J., Oberhollenzer F., Bonora E., Willeit J., Schwartz D.A.: Toll-like receptor 4 polymorphisms and arterogenesis. *N. Engl. J. Med.*, 2002; 3 47: 185–192.
148. Kielstein J.T., Zoccali C.: Asymmetric dimethylarginine: a cardiovascular risk factor and a uremic toxin coming of age? *Am. J. Kidney. Dis.* 2005; 46: 186–202.
149. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2001; 12: 383–389.
150. Kitano H.: Computational systems biology. *Nature*, 2002; 420: 206–210.
151. Kitano H.: Systems biology: a brief overview. *Science*, 2002; 295: 1662–1664.
152. Klima Ł., Stolorz-Skrzypek K., Olszanecki R., Kawecka-Jaszcz K.: Udział stresu oksydacyjnego w patogenezie nadciśnienia tętniczego – rola metylowanych arginin. *Kardiol. Pol.* 2011; 69: 94–99.
153. Kłuciński P, Martirosian G.: Rola odpowiedzi immunologicznej Th1 i Th2 w rozwoju miażdżycy. *Pol. Prz. Kardiol.*, 2006; 8: 119–123.
154. Knapik-Kordecka M., Piwowar A., Warwas M.: Zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej a czynniki ryzyka miażdżycy i powikłania naczyniowe u chorych na cukrzycę typu 2. *Wiad. Lek.*, 2007; 60: 329–334.
155. Knoflach M., Mayrl B., Mayerl C., Sedivy R., Wick G.: Atherosclerosis as a paradigmatic disease of the elderly: role of the immune system. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, 2003; 23: 117–132.
156. Kokot F, Ficek R., Bałanowski M.: Zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej a układ sercowo-naczyniowy. [W:] Pasiński T, Myśliwiec M., Imiela J. [red.] *Kardionefrologia. Medical Tribune Polska, Warszawa, 2006.*
157. Kollertis B, Krane V, Drechsler C, Lamina C, Marz W, Ritz E, Wanner C, Kronenberg F, Apolipoprotein AIV concentrations and clinical outcomes in haemodialysis patients with type 2 diabetes mellitus – a post hoc analysis of 4D. *J. Int. Med.* 2012; 272: 592–600.
158. Konstantinov I.E., Mejevoi N., Anichkov N.M.: Nikolai N. Anichkov and His Theory of Atherosclerosis. *Tex. Heart Inst. J.*, 2006; 33: 417–423.
159. Kopple J.D., Zhu X., Lew N.L., Lowrie E.G.: Body weight-for –height relationships predict mortality in maintenance hemodialysis patients. *Kidney Int.*, 1999; 56: 1136–1148.
160. Korhonen R., Lahti A., Kankaaranta H., Moilanen E.: Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug Targets – Inflamm. Allergy*, 2005; 4: 471–479.

161. Kossowska B., Dudka I., Gancarz R., Antonowicz-Januchowicz J.: Analiza proteomiczna profilu białkowych w niektórych stanach patologicznych ludzkiego organizmu. *Postepy Hig. Med. Dosw. (online)* 2009; 63: 549–563.
162. Kościów K., Małecki R., Adamiec R.: Cytokiny, metaloproteinaz i neopteryna a śmiertelność sercowo-naczyniowa chorych na przewlekłą niewydolność nerek. *Pol. Merk. Lek.* 2007; 127: 54–57.
163. Kośmicki M.: Czynniki zakaźne w patogenezie choroby wieńcowej. Czynniki zakaźne w patogenezie choroby wieńcowej. *Przew. Lek.*, 2004; 11: 35–43.
164. Kowalczyk E., Kopff A., Kopff M., Błaszczak J., Fijałkowski P., Kowalski J.: Metabolizm tlenu azotu. *Wiad. Lek.*, 2006; LIX: 11–12.
165. Kozłowska-Murawska J., Obuchowicz A.: Przydatność kliniczna oznaczania stężenia neopteryny. *Wiad. Lek.* 2008; 10–12: 269–272.
166. Kronenberg F., Kuen E., Pitz E., Koning at all Apolipoprotein aIV serum concentration are elevated in patients with mild and moderate renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 461–469.
167. Kronenberg F., Kuen E., Pitz E., Koning P. Kraatz G., Lhotta K. et al.: Apolipoprotein A-IV serum concentration are elevated in patients with mild and moderate renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2002; 13: 461–469.
168. Kuchroo V.K., Das M.P., Brown J.A: B7–1 and B7–2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways; application to autoimmune disease therapy. *Cell*, 2000; 80: 707–718.
169. Kurth T., de Jong P.E., Cook N.R., Buring J.E., Ridker P.M.: Kidney function and risk of cardiovascular disease and mortality in women: a prospective cohort study. *BMJ*, 2009; 338: b2392. doi: 10.1136/bmj.b2392.
170. Lamb D.J., El-Sankary W., Ferns G.A.: Molecular mimicry in atherosclerosis: a role for heat shock proteins in immunisation. *Atherosclerosis*, 2002; 167: 177–185.
171. Lamon B.D., Hajjar D.P.: Inflammation at the molecular interface of atherogenesis. *Review. Am. J. Pathol.*, 2008; 173: 1253–1264.
172. Landi F., Onder G., Gambassi G., Pedone C., Carbonin P., Bernabei R.: Body mass index and mortality among hospitalized patients. *Arch. Intern. Med.*, 2000; 160: 2641–2644.
173. Lane H.A., Smith J.C., Davies J.S.: Noninvasive assessment of preclinical atherosclerosis. *Vasc. Health Risk Manag.*, 2006; 2: 19–30.
174. Laurat E., Poirier B., Tupin E., Caligiuri G., Hansson G.K., Bariéty J., Nicoletti A.: In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*, 2002; 104: 197–202.
175. Leibowitz J.: *The History of Coronary Disease*. London, Wellcome Institute of the History of Medicine, 1970.
176. Leitinger N.: A role for phospholipid oxidation products as modulators of inflammatory reactions in atherogenesis. *Acta Angiol.* 2002; 8: 117–126.
177. Leu HB, Chen JW, Wu TC, Ding YA, Lin SJ, Charng MJ. Effects of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on serum levels of interleukin-18 and matrix met-

- allopeptinase-9 in patients with hypercholesterolemia. *Clin. Cardiol.*, 2005; 28: 423–28.
178. Levey A.S., Bosch J.P., Lewis J.B., Greene T., Rogers N., Roth D.: A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann. Intern. Med.*, 1999; 130: 461–470.
  179. Levey A.S., Eckardt K.U., Tsukamoto Y., Levin A., Coresh J., Rossert J., DeZeeuw D., Hostetter T.H., Lameire N., Eknoyan G.: Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) *Kidney Int.*, 2005; 67: 2089–2095.
  180. Libby P.: Changing concepts of atherogenesis. *J. Intern. Med.*, 2000; 247: 349–358.
  181. Libby P.: Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2001; 420: 868–874.
  182. Libby P., Theroux P.: Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, 2005; 111: 3481–3488.
  183. Lindner A., Charra B., Sherrard D.J., Scribner B.H.: Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N. Engl. J. Med.*, 1974; 290: 697–701.
  184. Lobstein J.F.: *Lehrbuch der pathologischen Anatomie*. Fr. Brodhagische Buchhandlung, Stuttgart, 1834 (<http://archive.org/details/lehrbuchderpatho01lobs>).
  185. Loscalzo J., Barabasi A.L.: Systems biology and the future medicine. *WIREs Syst. Biol. Med.* 2011, doi: 10.1002/wsbm.144
  186. Lowrie E.G., Lew N.L.: Death risk in hemodialysis patients: The predictive value of commonly measured variables and an evaluation of death rate differences between facilities. *Am. J. Kidney Dis.*, 1990; 15: 458–482.
  187. Luczak M., Figlerowicz M., Wojtaszek P.: Aspekty metodyczne analiz proteomicznych z wykorzystaniem metod elektroforezy dwukierunkowej i spektrometrii mas. *Biotechnologia* 2009; 2; 7–26.
  188. Luczak M., Formanowicz D., Pawliczak E., Wanic-Kosowska M., Wykretowicz A., Figlerowicz M. Chronic kidney disease-related arteriosclerosis – plasma proteomic study. *Proteome Sci.*, 2011, 9: 25.
  189. Lusis A.J.: Atherosclerosis. *Nature*, 2000; 407: 233–241.
  190. Maas R., Böger R.H.: Old and new cardiovascular risk factors: from unresolved issues to new opportunities, *Atherosclerosis* 2003; Suppl. 4: 5–7.
  191. Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Besnard S, Lesèche G, Chvatchko Y, Tedqui A. Expression of Interleukin-18 in Human Atherosclerotic Plaques and Relation to Plaque Instability. *Circulation* 2001;104:1598–603
  192. Mancia G., Laurent S., Agabiti-Rosei E., i wsp.: Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. *J. Hypertens.* 2009; 27(11): 2121–2158.
  193. Mantur M., Wojszel J.: Cząsteczki adhezyjne oraz ich udział w procesie zapalnym i nowotworowym. *Pol. Merk. Lek.*, 2008; 140: 177–180.
  194. Marchand F. Ueber Atherosclerosis. *Verhandlungen der Kongresse fuer Innere Medizin*. 21 Kongresse, 1904.

195. Martinez-Pinna R., Martin-Ventura J.L., Mas S., Blanco-Colio L.M., Tuñón J, Egido J.: Proteomics in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.*, 2008; 10: 209–215.
196. Martin-Ventura J.L., Blanco-Colio L.M., Tuñón J., Muñoz-García B., Madrigal-Matute J., Moreno J.A., Vega de Céniga M., Egido J.: Biomarkers in Cardiovascular Medicine. *Rev. Esp. Cardiol.*, 2009; 62: 677–688.
197. Masztalewicz M., Drechsler H., Nowacki P.: Czynniki zapalne i immunologiczne w patogenezie niedokrwiennego udaru mózgu. *Udar Mózgu*, 2008; 10: 1–7.
198. Matrix Science Ltd.: <http://www.matrixscience.com>
199. Matsuno H., Li C., Miyano S.: Petri net based descriptoon for systematic understanding of biological pathways. *EICE Trans. Fundam. Electron. Commun. Comput. Sci.*, 2006; E89-A(11): 3166–3174.
200. Matzinger P.: Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.*, 1994; 12: 991–1045.
201. Matzinger P.: The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science*, 2002; 296: 301–305.
202. Matzinger P.: The evolution of the danger theory. *Expert. Rev. Clin. Immunol.*, 2012; 8: 311–317.
203. Mayr M., Kiechl S., Willeit J., Wick G., Xu Q.: Infections, immunity, and atherosclerosis. Associations of antibodies to Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, and Cytomegalovirus with immune reactions to heat-shock protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis. *Circultaion*, 2000; 102; 833–839.
204. Mc Cully K.: Atherogenesis and the chemical pathology of homocysteine. *Eur. J. Lab. Med.*, 1966; 4: 121–128.
205. Meir K.S., Leitersdorf E.: Atherosclerosis in the apolipoprotein E – deficient mouse. A decade of progress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004; 24: 1006–1014.
206. Mertens A, Hobvoet P. Oxidized and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J.*, 2001; 15: 2073–2084.
207. Methe H., Brunner S., Wiegand D., Nabauer M., Koglin J., Edelman E.R.: Enhanced T-helper-1 lymphocyte activation patterns in acute coronary syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2005; 45: 1939–1945.
208. Miller Y., Viriaykosol S., Binder C.J., Feramisco J.R., Kirkland T.N., Witztum J.L.: Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TL4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 1561–1568.
209. Millonig G., Malcolm G.T., Wick G.: Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study. *Atherosclerosis*, 2002; 45: 441–448.
210. Mittelbrunn M., Molina A., Escribese M.M., Yanez-Mó M., Escudero E., Ursa A., Tejedor R., Mampaso F., Sanchez-Madrid F.: VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. *PNAS.*, 2004; 101: 11058–11063.
211. Młynarski W.: Rekombinacja homologiczna i zarodkowe komórki macierzyste, czyli nowa epoka w zrozumieniu patogenezy chorób – nagroda Nobla w zakresie medycyny i fizjologii w roku 2007. *Przegl. Pediatr.*, 2007; 37: 347–349.

212. Moncada S., Palmer R., Higgs E.A.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991; 43: 109–142.
213. Moseley P.: Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology*, 2000; 48: 299–302.
214. Muntner P., He J., Astor B.C., Folsom A.R. Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005; 16: 529–538.
215. Murata T.: Petri nets: Properties, analysis and applications. *Proceeding of the IEEE*, 1989; 77: 541–580.
216. Musiał K., Zwolińska D.: Białka szoku cieplnego w przewlekłej chorobie nerek – obrońcy czy agresorzy? *Nefrol. Dial. Pol.*, 2011; 24: 206–210.
217. Myśliwiec M., Pasiński T.: Uszkodzenie ściany naczyń w niewydolności nerek [W:] Pasiński T., Myśliwiec M., Imiela J. [red.] *Kardionefrologia*. Medical Tribune Polska, Warszawa, 2006.
218. Natora M., Zdrojewski Z.: Znaczenie asymetrycznej dimetylargininy (ADMA) w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. *Nefrol. Dial. Pol.*, 2006; 10: 95–100.
219. Naruszewicz M.: Aktualne spojrzenie na rolę hiperhomocysteinemii w patogenezie miażdżycy. *Pol. Prz. Neurol.*, 2005; 1: 19–22.
220. Nathan C.: Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420: 846–852.
221. Navaneethan S.D., Pansini F., Perkovic V., Manno C., Pellegrini F., Johnson D.W., Craig J.C., Strippoli G.F.M.: HMGCoA reductase inhibitors (statins) for people with chronic kidney disease not requiring dialysis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2009, Issue 2. Art. No.: CD007784. doi: 10.1002/14651858.CD007784.
222. Nieto F.J.: Infections and atherosclerosis: new clues from an old hypothesis? *Am. J. Epidemiol.* 1998; 148: 937–48.
223. Nishizawa Y., Shoji T., Ishimura E., Inaba M.M., Morii H.: Paradox of risk factors for cardiovascular mortality in uremia: Is high cholesterol level better for atherosclerosis in uremia? *Am. J. Kidney Dis.*, (Suppl 1) 2001; 38: 4–7.
224. Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yoshimoto T, Nakanishi T. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv. Immunol.* 1998; 70: 281–312
225. Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995;378: 88–91.
226. Oliński R., Jurgowiak M.: Iron metabolism, oxidative DNA damage and atherosclerosis. *Acta Angiol.*, 2002; 8: 37–44.
227. Olsson M.G., Olofsson T., Åkerström B.: Up-regulation of  $\alpha_1$ -microglobulin by hemoglobin and pro-oxidants in hepatoma and blood cell lines. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007; 15: 842–851.
228. Oram J.F., Heinecke J.W.: ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol. Rev.*, 2005; 85: 1343–1372.

229. Osterloh A., Kalinke U., Weiss S. Fleischer B., Breloer M.: Synergistic and differential modulation of immune responses by Hsp60 and lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 4669–4680.
230. Pasiński T., Gaciąg Z.: *Rozwój i regresja miażdżycy*. [W:] Pasiński T., Gaciąg Z., Torbicki A., Szmidt J. [red.] *Angiologia*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2004.
231. Pasiński T.: Imiela J.: *Epidemiologia chorób sercowo-naczyniowych u pacjentów z chorobami nerek*. [W:] Pasiński T., Myśliwiec M., Imiela J. [red.] *Kardionefrologia*. Medical Tribune, Warszawa, 2006.
232. Pawlak K., Pawlak D., Myśliwiec M.: Circulating  $\beta$ -chemokines and matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 system in hemodialyzed patients – Role of oxidative stress. *Cytokine* 2005; 31: 18–24.
233. Pawlus J., Rusak M., Chociej-Stypułkowska J, Dąbrowska M.: Parametry aktywacji płytek krwi i stężenie mieloperoksydazy, jako markery choroby niedokrwiennej serca. *Pol. Merk. Lek.*, 2010; 172: 259–262.
234. Petri C.A.: *Communication mit Automaten*. Dissertation, Institut für Instrumentelle Mathematik, Schriften des IIM 3, Bonn 1962.
235. Phipps R.P.: Atherosclerosis: the emerging role of inflammation and the CD40-CD40L system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 97: 6930–6932.
236. Pikto-Pietkiewicz W., Pasiński T.: *Zaburzenia lipidowe w chorobach nerek* [W:] Pasiński T., Myśliwiec M., Imiela J. [red.] *Kardionefrologia*. Medical Tribune Polska, Warszawa, 2006.
237. Pikto-Pietkiewicz W., Pasiński T.: *Czynniki ryzyka miażdżycy u chorych z przewlekłą chorobą nerek* [W:] Pasiński T., Myśliwiec M., Imiela J. [red.] *Kardionefrologia*. Medical Tribune Polska, Warszawa, 2006.
238. Plump A.S., Smith J.D., Hayek T, Aalto-Setälä K., Walsh A., Verstyft J.G., Rubin E.M., Breslow J.L.: Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E – deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell.*, 1992; 71: 343–353.
239. Pocley A.G.: Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation*, 2001; 105: 1012–1017.
240. Popa A.J., Karupiah K., Cardounel A.J.: Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacol. Res.* 2009; 60: 461–465.
241. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *New Engl. J. Med.*, 1998; 339: 1349–1357.
242. Pręgoska-Chwała B., Pręgoski J., Januszewicz A.: Związek między grubością błony wewnętrznej i środkowej (IMT) tętnicy szyjnej a powikłaniami w układzie sercowo-naczyniowym. *Arterial Hypertension* 2008; 12: 454–463.
243. Rabczyński M., Adamiec R., Olszewska-Rocznik.: Przeciwciała anty-HSP 60/50 – rola w patogenezie miażdżycy, czynniki ryzyka rozwoju blaszki miażdżycowej. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2006; 15: 933–939.

244. Ramachandran S.V.: Biomarkers of cardiovascular disease: Molecular Basis and Practical Considerations. *Circulation*, 2006; 113: 2335–2362.
245. Ramage J.M., Young J.L., Goodall J.C., Gaston J.S.: T cell responses to heat-shock protein 60: differential responses by CD4+ T cell subsets according to their expression of CD45 isotypes. *J. Immunol.*, 1999; 162: 704–710.
246. Ramsey S.A., Gold E.S., Aderem A.: A systems biology approach to understanding atherosclerosis. *EMBO Mol. Med.*, 2010; 2: 79–89.
247. Reisig W.: *Petri nets: an introduction*. Springer-Verlag, Berlin, 1985.
248. Ritz E., Nowicki M., Wiecek A.: Excess cardiovascular mortality in uremic patient – What does it teach for other risk factors in the non-renal patients? *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 1994; 92: 110–116.
249. Roselaar S.E., Kakkanathu P.X., Daugherty A.: Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE -/- and LDL receptor -/- mice. Decreasing density with disease progression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1996; 16: 1013–1018.
250. Ross R.: The pathogenesis of atherosclerosis – an update. *New. Engl. J. Med.*, 1986; 20: 488–500.
251. Ross R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993; 362: 801–809.
252. Ross R.: Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.*, 1999; 340: 115–126.
253. Ross R., Fagiotto A., Bowen-Pope D., Raines E.: The role of endothelial injury and platelet and macrophage interactions in atherosclerosis. *Circulation.*, 1984; 70: 77–82.
254. Ross R., Glomset J.A.: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*, 1973; 180: 1332–1339.
255. Ross R., Glomset J.A.: The pathogenesis of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1976; 295: 369–377; 420–425.
256. Ross R., Glomset J., Kariya B., Harker L.: A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1974; 71: 1207–1210.
257. Roy Chowdhury S.K., Sangle G.V., Xie X., Stelmack G.L., Halayko A.J., Shen G.X.: Effects of extensively oxidized low-density lipoprotein on mitochondrial function and reactive oxygen species in porcine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2010; 298: 89–98.
258. Rutkowski B., Czekalski S., Król E.: Rozpoznawanie i leczenie przewlekłej choroby nerek. [W]: Rutkowski B, Czekalski S (red.) *Rozpoznawanie i leczenie chorób nerek – wytyczne, zalecenia i standardy postępowania*. Wydawnictwo Termedia, Poznań 2008;
259. Rutkowski B., Lichodziejewska-Niemierko M., Grenda R.: *Raport o stanie leczenia nerkozastępczego w Polsce – 2010*. Drukonsul, Gdańsk 2011.
260. Rutkowski B., Lichodziejewska-Niemierko M., Grenda R., Czekalski S., Durlik M., Bautembach S.: *Raport o stanie leczenia nerkozastępczego w Polsce – 2007*. Drukonsul, Gdańsk 2009.



261. Rutkowski B., Tylicki L.: Kryteria rozpoznawania i przebieg kliniczny nefropatii naciśnieniowej. [W:] Czekalski S., Rutkowski B. (red.) Nefropatia nadciśnieniowa. Termedia Wydawnictwo Medyczne, Poznań 2007.
262. Rutkowski R., Pancewicz S., Rutkowski K., Rutkowska J.: Znaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w patomechanizmie procesu zapalnego. *Pol. Merk. Lek.*, 2007; 134: 131–136.
263. Sackmann A.: Discrete modeling. [W:] Koch I, Reisisg W, Schreiber F, Dress A, Vingron M, Myers G, Giegerich R, Fitch W, Pevzner P.A. [reds.] *Modeling in Systems Biology*, vol 16 seria *Computational Biology*, Springer-Verlag, 1<sup>st</sup> edition, London 2011, s. 59–72.
264. Sackmann A., Formanowicz D., Formanowicz P., Koch I., Blazewicz J.: An analysis of the Petri net based model of the human body iron homeostasis process. *Computat. Biol. Chem.*, 2007; 31: 1–10.
265. Sackmann A., Formanowicz D., Formanowicz P., Błażewicz J.: New insights into the human body iron metabolism analysed by a Petri net based approach. *Biosystems* 2009; 96: 104–113.
266. Sackmann A., Heiner M., Koch I.: Application of Petri net based analysis techniques to signal transduction pathways. *BMC Bioinform.*, 2006; 6: 482.
267. Sahar S, Dwarakanath RS, Reddy MA, Lanting L, Todorov I, Natarajan R. Angiotensin II enhances interleukin-18 mediated inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells: a novel cross-talk in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2005; 96: 1064–1071.
268. Sakharov D.V., Elstak E.D.R., Chenryak B.V., Wirtz K.W.A.: Prolonged lipid oxidation after photodynamic treatment. Study with oxidation-sensitive probe C11-BODIPY581/591. *FEBS Lett.*, 2005; 579: 1255–1260.
269. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.*, 1994; 344: 1383–1389.
270. Schlessinger S.D., Tankersley M.R., Curtis J.J.: Clinical documentation of end-stage renal disease due to hypertension. *Am. J. Kidney Dis.* 1994; 23, 5: 655S–660S.
271. Schonbeck U., Sukhova G.K., Gardes N., Libby P.: Th2 predominant immune responses prevail in human abdominal aortic aneurysm. *Am. J. Pathol.*, 2002; 161: 499–506.
272. Shalhoub J., Falck-Hansen M.A., Davies A.H., Monaco C.: Innate immunity and monocyte-macrophage activation in atherosclerosis. *J. Inflamm.*, 2011; 8: 9.
273. Shlipak M.G., Fried L.F., Cushman M., Manolio T.A., Peterson D., Stehman-Breen C., Bleyer A., Newman A., Siscovick D., Psaty B.: Cardiovascular mortality risk in chronic kidney disease: comparison of traditional and novel risk factors. *JAMA*, 2005; 293: 1737–1745.
274. Shlipak M.G., Sarnak M.J., Katz R., Fried L.F., Seliger S.L., Newman A.B., Siscovick D.S., Stehman-Breen C.: Cystatin C and the risk of death and cardiovascular events among elderly persons. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 352: 2049–2060.

275. Shoenfeld Y., Sherer Y., Hartas D.: Atherosclerosis as infectious, inflammatory and autoimmune disease. *TRENDS Immunol.*, 2001; 22: 293–295.
276. Skalska A.: Wolne rodniki tlenowe a nadciśnienie tętnicze. *Nadciśnienie Tętnicze*, 2001; 5: 147–158.
277. Skoczyńska A.: Rola lipidów w powstawaniu miażdżycy. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2005; 59: 346–357.
278. Skoczyńska A.: *Patogeneza miażdżycy*. Wydawnictwo Elsevier Urban & Partner Sp. z o. o., Wrocław 2006.
279. Smithies O., Gregg R.G., Boggs S.S. Koralewski M.A., Kucherlapati R.S.: Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, 1985; 317: 230–234.
280. Sokołowska J.: Historia badań nad miażdżycą oraz rolę homocysteiny w patogenezie zmian miażdżycowych. *Now. Lek.*, 2003; 6: 473–476.
281. Stamler J.S., Simon D.I., Osborne J.A., Mullins M.E., Jaraki O., Michel T., Singel D.J., Loscalzo J.: S – nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992; 89: 444–448.
282. Stanisz A.: *Przystępny kurs statystyki z wykorzystaniem programu STATISTICA PL na przykładach medycyny. Tom II*. StatSoft Polska Sp. z.o.o., Kraków 2000.
283. Stanisz A.: *Przystępny kurs statystyki z wykorzystaniem programu STATISTICA PL na przykładach medycyny. Tom I*. StatSoft Polska Sp. z.o.o., Kraków 2001.
284. Steinberg D.: Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*, 1997; 95: 1062–1071
285. Steinberg D.: Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat. Med.*, 2002; 8: 1211–1217.
286. Steinberg D., Parthasarathy S., Caerw T.E., Khoo J.C., Witztum J.L.: Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Eng. J. Med.*, 1989; 320: 915–924.
287. Stemme S., Faber B., Holm J., Wiklund O., Witztum J.L., Hansson.: T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1995; 92: 3893–3897.
288. Stewart C.R., Stuart L.M., Wilkinson K., van Gils J.M., Deng J., Halle A., Rayner K.J., Boyer L., Zhong R., Frazier W.A., Lacy-Hulbert A., El Khoury J., Golenbock D.T., Moore K.J.: CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.*, 2010; 11: 155–161.
289. Stevens J., Cai J., Pamuk E.R., Williamson D.F., Thun M.J., Wood J.L.: The effect of age on the association between body-mass index and mortality. *N. Engl. J. Med.*, 1998; 338: 1–7.
290. Stocker R., Keaney J.F.: Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.*, 2004; 84: 1381–1478.
291. Sudnik U., Bachórzewska-Gajewska H., Dobrzycki S., Malyszko J.: Przewlekła choroba nerek u pacjenta kardiologicznego. Możliwości oceny funkcji nerek w codziennej praktyce lekarskiej. *KOF* 2010; 3: 302–312.

292. Sullivan J.L.: Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet*, 1981; 1: 1293–1294.
293. Tabas I: Lipids and atherosclerosis. [W:] Vance D.E., Vance J.E. [red.] *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, Amsterdam 2002.
294. Taniguchi A., Nishimura F., Murayama Y., Nagasaka S., Fukushima M., Sakai M., Yoshii S., Kuroe A., Suzuki H., Iwamoto Y., Soga Y., Okumura T., Ogura M., Yamada Y., Seino Y., Nakai Y.: Porphyromonas gingivalis infection is associated with carotid atherosclerosis in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism*, 2003; 52: 142–145.
295. Tedgui A., Mallat Z.: Cytokines in atherosclerosis. Pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.*, 2006; 86: 515–581.
296. Tenger C., Sundborger A., Jawien J., Zhou X.: IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN-gamma and CXCL16 expression independently of T cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005; 25: 791–796.
297. Thomas K.R., Capecchi M.R.: Targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1986; 51: 1101–1113.
298. Thomas K.R., Capecchi M.R.: Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987; 51: 503–512.
299. Tran C.T.L., Leiper M., Vallance P.: The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscl. Suppl.* 2003; 4: 33–40.
300. Tukaj S., Lipińska B.: Białka szoku termicznego w reumatoidalnym zapaleniu stawów: przyjaciel czy wróg? *Postepy Hig. Med. Dosw.*, (online) 2011; 65: 427–436.
301. Tumisto T.T., Binder B.R., Ylä-Herttuala S.: Genetics, genomics and proteomics in atherosclerosis research. *Ann. Med.*, 2005; 37: 323–332.
302. Turunen M.P., Aavik E., Ylä-Herttuala S.: Epigenetics and atherosclerosis. *Bioch. Biophys. Acta.*, 2009; 1790: 886–891.
303. Undas R.: Patogeneza aterosklerozy. *Forum Med. Rodz.*, 2009; 3: 396–401.
304. U S Renal Data System, *USRDS 2012 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2012.
305. Vallance P., Leiper J.: Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004; 24: 1023–1030.
306. Vallance P., Leone A., Calver A., Collier J., Moncada S.: Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in renal failure. *Lancet*, 1992; 339: 572–575.
307. Vaziri N.D. Dyslipidemia of chronic renal failure: the nature, mechanisms, and potential consequences. *Am J. Physiol.*, 2006; 290: 262–272.
308. Vaziri N.D., Navab M., Fogelman A.M.: HDL metabolism and activity in chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2010; 6: 287–296.
309. Vergnani L., Hatrik S., Ricci F., Passaro A., Manzoli N., Zuliani G., Brovkovch V., Fellin R., Malinski T.: Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on en-

- dothelial nitric oxide and superoxide production. *Circulation*, 2000; 101: 1261–1266.
310. Volpato S., Leveille S.G., Corti M.C., Harris T.B., Guralnik J.M.: The value of serum albumin and high-density lipoprotein cholesterol in defining mortality risk in older persons with low serum cholesterol. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 2001; 49: 1142–1147.
311. von Bertalanffy L. *Theoretische Biologie, Band I: Allgemeine Theorie, Physikochemie, Aufbau und Entwicklung des Organismus*. Gebrüder Borntraeger; Berlin, Germany, 1932.
312. von Bertalanffy L.: Untersuchungen über die Gesetzlichkeit des Wachstums I. Allgemeine Grundlagen der Theorie. Mathematisch-physiologische Gesetzlichkeiten des Wachstums bei Wassertieren. *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*, 1934; 131: 613–652.
313. von Bertalanffy L.: *General System Theory: Foundations, Development, Applications*. G. Braziller, New York, 1969.
314. Walski M., Frontczak-Baniewicz M.: Cechy ultrastrukturalne prawidłowego i dysfunkcyjnego śródbłonna naczyń krwionośnych. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2007; 117 (Suppl): 46–49.
315. Wanner C., Krane C., März W., Olschewski M., Mann J.F., Ruf G., Ritz E., German Diabetes and Dialysis Study Investigators: Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 353: 238–248.
316. Wegener J., Schwarick M., Heiner M.: A Plugin System for Charlie. *Proc. International Workshop CSP*, 2011: 531–554.
317. Weiner D.E., Tighiouart H., Amin M.G., Stark P.C., MacLeod B., Griffith J.L., Salem D.N., Levey A.S., Sarnak M.J.: Chronic kidney disease as a risk factor for cardiovascular disease and all-cause mortality: a pooled analysis of communitybased studies. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2004; 15: 1307–1315.
318. Weiner D.E., Tighiouart H., Stark P.C., Amin M.G., MacLeod B., Griffith J.L., Salem D.N., Levey A.S., Sarnak M.J.: Kidney disease as a risk factor for recurrent cardiovascular disease and mortality. *Am. J. Kidney Dis.*, 2004; 44: 198–206.
319. Węclawek-Tompol J., Chybicka A., Rybka B., Noworolska-Sauren D., Ryczan R.: Rola komórek dendrytycznych w układzie odpornościowym. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2004; 13: 4, 651–662.
320. Wick G., Kleindienst R., Dietrich H., Xu Q.: Is atherosclerosis an autoimmune disease? *Trends Food Sci. Technol.*, 1992; 3: 114–119.
321. Wick G., Schett G., Amberger A., Kleidienst R., Xu Q.: Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol. Today.*, 1995; 16: 27–33.
322. Wick G., Romen M., Ambereger A., Metzler B., Mayr M., Falkensammer G., Xu Q.: Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue. *FASEB J.*, 1997; 11: 1199–1207.
323. Wick G., Knoflach M., Xu Q.: Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004; 22: 361–403.

324. Wieliczko M., Matuszkiewicz-Rowińska J., Włodarczyk D., Bijak K., Przedlacki J., Niemczyk S., Ostrowski K.: Związek pomiędzy markerami stanu zapalnego a miażdżycą tętnic szyjnych i zdarzeniami sercowo-naczyniowymi u chorych przewlekle hemodializowanych. *Nephrol. Dial. Pol.*, 2006; 10: 21–25.
325. Wietlicka I., Korzeniewska K., Jabłeczka A.: Neopteryna. *Farm. Współ.*, 2008; 1: 241–247.
326. Wnuczko K., Szczepański M.: Śródbłonek – charakterystyka i funkcje. *Pol. Merk. Lek.*, 2007; 133: 60–65.
327. Xu Q.B., Oberhuber G., Gruschwitz M., Wick G.: Immunology of atherosclerosis: cellular composition and major histocompatibility complex class II antigen expression in aortic intima, fatty streaks, and atherosclerotic plaques in young and aged human specimens. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1990; 56: 344–359.
328. Yamagami H., Kitagawa K., Hoshi T, Furukado S, Hougaku H, Nagai Y, Hori M. Associations of serum IL-18 levels with carotid intima-media thickness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005;25:1458–62.
329. Yamashita H., Shimada K., Seki E., Mokuno H., Daida H.: Concentrations of interleukins, interferon, and C-reactive protein in stable and unstable angina pectoris. *Am. J. Cardiol.*, 2003; 91: 133–136.
330. Zhu J., Quyyumi A.A., Rott D., Csako G., Wu H., Halcox J., Epstein S.E.: Antibodies to human heat-shock protein-60 are associated with the presence and severity of coronary artery disease. Evidence for an autoimmune component of atherogenesis. *Circulation*, 2001; 103: 1071–1075.
331. Zoccali C., Bode-Böger S.M., Mallamaci F., Benedetto F., Tripepi G., Malatino L.: Plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001; 358: 2113–2117.
332. Zügel U., Schoel B., Yamamoto S., Hengel H., Morein B., Kaufmann S.H.: Crossrecognition by CD8 T cell receptor alpha beta cytotoxic T lymphocytes of peptides in the self and the mycobacterial hsp60 which share intermediate sequence homology. *Eur. J. Immunol.*, 1995; 25: 451–458.

