

Katedra i Zakład Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

**Weronika Oleśkowska-Florek**

**OCENA PARAMETRÓW ZAPALNYCH W SUROWICY  
CHORYCH DIALIZOWANYCH I WPLYWU TEJ SUROWICY  
NA KOMÓRKI ŚRÓDBŁONKA W HODOWLI IN VITRO**

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. med. Małgorzata Pyda prof. UM

Poznań 2013

## SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów	4
<b>1. WSTĘP</b>	<b>7</b>
1.1. Charakterystyka i czynność śródbłonka naczyniowego	7
1.1.1. Czynniki naczyniorozszerzające i naczynioskurczowe	8
1.1.2. Czynniki wpływające na regulację krzepnięcia i fibrynolizy	9
1.1.3. Cytokiny i cząsteczki adhezyjne	10
1.2. Ocena funkcji śródbłonka naczyniowego	11
1.3. Dysfunkcja śródbłonka naczyniowego	12
1.4. Wpływ hemodializy na dysfunkcję śródbłonka naczyniowego	13
1.4.1. Wpływ hemodializy na czynność rozkurczową śródbłonka naczyniowego	13
1.4.2. Hemodializa a stres oksydacyjny	15
1.4.3. Hemodializa a występowanie stanu zapalnego	17
1.4.4. Inne czynniki związane z dysfunkcją śródbłonka naczyniowego u chorych hemodializowanych	19
1.4.5. Hemodializa a występowanie zwapnień w naczyniach krwionośnych	21
1.4.6. Wpływ użytej błony dializacyjnej na dysfunkcję śródbłonka naczyniowego	22
<b>2. CEL PRACY</b>	<b>24</b>
<b>3. MATERIAŁ I METODA</b>	<b>25</b>
3.1. Badani chorzy	25
3.2. Schemat hemodializy	25
3.3. Materiał do badań	25
3.4. Hodowla komórkowa	26
3.4.1. Ocena proliferacji komórek śródbłonka	27

3.4.2. Generacja wolnych rodników w komórkach śródbłónka	27
3.4.3. Synteza cytokin prozapalnych przez komórki śródbłónka	29
<b>4. OCENA REAKCJI ZAPALNEJ I STRESU OKSYDACYJNEGO</b>	<b>30</b>
4.1. Interleukina-6 (IL-6)	30
4.2. Białko Chemotaktyczne dla Monocytów (MCP-1)	30
4.3. Czynn timer Wzrostu Śródbłónka Naczyń (VEGF)	31
4.4. Czynn timer Wzrostu Hepatocytów (HGF)	31
4.5. Asymetryczna dimetyloarginina (ADMA)	31
4.6. Pentraksyna - 3 (PTX-3)	32
4.7. Białko karbonylowane	32
4.8. Azotyny/Azotany	33
<b>5. ANALIZA STATYSTYCZNA</b>	<b>33</b>
<b>6. WYNIKI</b>	<b>34</b>
6.1. Badana populacja	34
6.2. Wpływ zabiegu hemodializy na stężenie ocenianych parametrów	35
6.3. Wpływ surowicy chorych uzyskanej <i>ex-vivo</i> na czynność komórek śródbłónka w hodowli <i>in vitro</i>	40
<b>7. OMÓWIENIE WYNIKÓW</b>	<b>44</b>
<b>8. WNIOSKI</b>	<b>61</b>
<b>9. STRESZCZENIE</b>	<b>62</b>
<b>10. SUMMARY</b>	<b>64</b>
<b>11. PIŚMIENNICTWO</b>	<b>66</b>

## Wykaz stosowanych skrótów

ADMA	(asymmetric dimethylarginine) asymetryczna dimetylarginina
ALA-D	(aminolevulinate dehydratase) dehydrataza $\delta$ -aminolewulinowa
AOPP	(advanced oxidation protein products) produkty zaawansowanego utlenienia białek
bFGF	(basic Fibroblast Growth Factor) zasadowy Czynn timer Wzrostu Fibroblastów
BSA	(bovine serum albumin) surowicza albumina bydłca
CEC	(circulating endothelial cells) krążące komórki śródbłnka
cGMP	(cyclic guanosine monophosphate) 3',5'-cykliczny guanozynomonofosforan
CPM	(counts per minute) ilość impulsów zliczona w czasie 1 minuty
CRP	(C-reactive protein) białko C-reaktywne
Cu-Zn-SOD	(Cu/Zn superoxide dismutase) dysmutaza ponadtlenkowa
DF	(dichlorodihydrofluorescein) 2'7'-dichlorodihydrofluoresceina
DDF	(dichlorodihydrofluorescein diacetate) dwuoctan 2'7'-dichlorodihydrofluoresceiny
DNP	2,4-dinitrofenol
DNPH	2,4-dinitrofenylohydrazyna
EDCF	(endothelium derived constricting factor) czynn timer skurczowe pochodzenia śródbłnkowego
EDHF	(Endothelium Derived Hyperpolarising Factor) Śródbłnkowy Czynn timer Hiperpolaryzujący
EDRF	(endothelium derived relaxing factor) czynn timer rozkurczowe pochodzenia śródbłnkowego
EDTA	(ethylenediaminetetraacetic acid) kwas etylenodwuaminoczteroocowy
EGF	(Epidermal Growth Factor) Naskórkowy Czynn timer Wzrostu
ELAM	(Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule) Cząsteczka Adhezyjna Komórek Śródbłnka dla Leukocytów
ELISA	(enzyme-linked immunosorbent assay) test immunoenzymosorbcyjny
EMP	(endothelial microparticles) mikrocząsteczki z komórek śródbłnka
eNOS	(endothelial nitric oxide synthase) syntaza tlenku azotu
EPC	(endothelial progenitor cells) komórki progenitorowe śródbłnka naczyniowego

ETA (endothelin receptor type A) receptory dla endoteliny typu A

ETB (endothelin B receptor type B) receptory dla endoteliny typu B

FMD (flow-mediated dilatation) reaktywność tętnicy ramiennej w odpowiedzi na niedokrwienie

GSH (glutathione) glutation

GSH-Px (glutathione peroxidase) peroksydaza glutationowa

GSH-Rx (glutathione reductase) reduktaza glutationowa

HDL (high density lipoprotein) lipoproteiny wysokiej gęstości

HGF (Hepatocyte Growth Factor) Czynniki Wzrostu Hepatocytów

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) komórki śródbłonna z ludzkiej żyły pępowinowej

ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) Międzykomórkowa Częsteczka Adhezyjna

IM area (intima-media cross-sectional area) pole powierzchni poprzecznej kompleksu intima-media

IMT (intima-media thickness) grubość kompleksu intima-media

INF Interferon

IL Interleukina

Kt/V parametr wydajności hemodializy

LDL (low-density lipoprotein) lipoproteina niskiej gęstości

Lp-PLA2 (lipoprotein-associated phospholipase A2) fosfolipaza A2 związana z lipoproteina

MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) Czynniki Chemotaktyczne dla Monocytów-1

MDA (malondialdehyde) malonyldialdehyd

mRNA (messenger RNA) matrycowy RNA

NaOH wodorotlenek sodu

NO (nitric oxide) tlenek azotu

1,2,3,- PAI (Plasminogen Activator Inhibitor) Inhibitory Aktywatorów Plazminogenu

PDGF (Platelet Derived Growth Factor) Płytkowy Czynniki Wzrostu

PTX-3 Pentraksyna-3

PWA (pulse wave analysis) analiza fali tętna

PWV (pulse wave velocity) ocena propagacji fali tętna

ROS (reactive oxygen species) reaktywne formy tlenu

SOD (superoxide dismutase) dysmutaza nadtlenkowa

TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) substancje reaktywne kwasu tiobarbiturowego

TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) Czynniki Martwicy Guza- $\alpha$

t-PA (tissue Plasminogen Activator) tkankowy Aktywator Plazminogenu

VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) Naczyniowa Cząsteczka Adhezyjna

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Czynniki Wzrostu Śródbłona Naczyń

vWF (von Willebrand Factor) Czynniki von Willebranda

## 1. WSTĘP

Choroby układu sercowo-naczyniowego są najczęstszą przyczyną zgonów u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek [1, 2]. Chorzy dializowani od 10 do 20 razy częściej niż w populacji ogólnej umierają z przyczyn sercowo-naczyniowych. Związane jest to z faktem, iż chorzy z przewlekłą chorobą nerek, zwłaszcza regularnie poddawani zabiegom hemodializy, narażeni są na przyspieszony rozwój miażdżycy [3-6]. Analiza autopsji oraz badań klinicznych wykazała znacznie częstsze występowanie miażdżycy w naczyniach wieńcowych u pacjentów hemodializowanych w porównaniu z pacjentami bez choroby nerek [7].

Wydaje się, iż dysfunkcja śródbłonna naczyniowego może być prawdopodobną przyczyną zwiększonego ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego w grupie chorych hemodializowanych [8]. Jednakże pytanie, czy sam zabieg hemodializy może prowadzić do dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, jest nadal tematem badań.

### 1.1. Charakterystyka i czynność śródbłonna naczyniowego

Śródbłonek naczyniowy jest największym organem ludzkiego organizmu [1, 9]. Organizm człowieka zawiera  $10^{13}$  komórek śródbłonna, których waga wynosi około 1 kg, a powierzchnia całkowita równa jest wielkości sześciu kortów tenisowych [3, 9]. Śródbłonek tworzy pojedynczą, ciągłą warstwę komórek wyściełających światło naczyń, które pokrywa glikokaliks zbudowany z mieszaniny glikoprotein i glikozaminoglikanów [10].

Śródbłonek jest metabolicznie aktywny, odgrywa znaczącą rolę w regulacji napięcia i przepuszczalności naczyń krwionośnych, transporcie makromolekuł, regulacji reakcji zapalnej oraz krzepnięcia, moduluje proliferację błony wewnętrznej i przebudowę ściany naczyniowej [11].

### 1.1.1. Czynniki naczyniorozszerzające i naczynioskurczowe

Śródbłonek uwalnia liczne substancje wazoaktywne, które można podzielić na dwie grupy: czynniki rozkurczowe pochodzenia śródbłonkowego (ang. *endothelium derived relaxing factor*, EDRF) oraz czynniki skurczowe pochodzenia śródbłonkowego (ang. *endothelium derived constricting factor*, EDCF). Czynniki rozkurczowe pochodzenia śródbłonkowego chronią układ naczyniowy przed rozwojem miażdżycy poprzez hamowanie adhezji monocytów oraz płytek krwi, proliferacji i migracji komórek mięśni gładkich, natomiast czynniki skurczowe pochodzenia śródbłonkowego mają właściwości nasilające rozwój miażdżycy [3].

Do czynników rozkurczowych pochodzenia śródbłonkowego zaliczyć można: tlenek azotu (NO), Śródbłonkowy Czynniki Hiperpolaryzujący (ang. *Endothelium Derived Hyperpolarising Factor*, EDHF) oraz prostacyclinę [9, 12-14]. Mediatorami wydzielanymi przez śródbłonek naczyniowy o działaniu wazokonstrykcyjnym są: endotelina-1, tromboksan A<sub>2</sub>, prostaglandyna F i prostaglandyna H [9, 12].

Tlenek azotu (NO) jest wytwarzany z L-argininy przez izoformę śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (ang. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS), która jest produktem genu NOS3. Uwalnianie NO z komórek śródbłonka jest stymulowane przez nasilony przepływ krwi, powodujący zwiększone napięcie styczne (ang. *shear stress*) powierzchni śródbłonka [14, 15] oraz przez takie substancje jak: bradykinina, acetylocholina i trombina [14]. Asymetryczna dimetylarginina (ang. *asymmetric dimethylarginine*, ADMA), endogenny inhibitor syntazy tlenu azotu, również hamuje jego powstawanie oraz modyfikuje czynność śródbłonka naczyniowego. Funkcja wazodylatacyjna tlenu azotu związana jest z jego interakcją z atomem żelaza hemu w cyklicznym guanozynomonofosforan (ang. *cyclic guanosine monophosphate*, cGMP). Tlenek azotu jest jednym z najsilniejszych czynników



rozkurczowych o działaniu para- i autokrynnym. NO pośredniczy również w procesach służących ochronie śródbłonka, hamuje ekspresję prozapalnych cytokin, chemokin oraz substancji adhezyjnych leukocytów, zapobiega rozwojowi miażdżycy oraz ma ogromny wpływ na działanie układu sercowo-naczyniowego [12, 16, 17]. Poza tym hamuje proliferację komórek mięśniowych naczyń krwionośnych oraz adhezję i agregację płytek krwi [12, 17].

Endotelina-1 jest jednym z najsilniejszych śródbłonkowych czynników naczynioskurczowych. Synteza endoteliny-1 jest pobudzana przez angiotensynę II [12], adrenalinę [14] oraz hipoksję [14, 18]. Endotelina-1 pobudza receptory błonowe ETA (znajdujące się na komórkach mięśni gładkich naczyń) oraz ETB (zlokalizowane na komórkach mięśni gładkich naczyń i śródbłonka) [19]. Działa ona wazokonstrykcyjnie, mitogennie i proagregacyjnie poprzez związanie z receptorami ETA, natomiast oddziałując na receptory śródbłonkowe ETB powoduje uwalnianie tlenu azotu i prostacykliny-2 oraz równoważy efekt wywołany stymulacją receptorów ETA [12, 19].

### **1.1.2. Czynniki wpływające na regulację krzepnięcia i fibrynolizy**

Śródbłonek naczyniowy odpowiada za utrzymanie hemostazy, ma właściwości przeciwwzakrzepowe, przeciwpłytkowe oraz fibrynolityczne [9, 14, 15]. Fizjologicznie przeważają czynniki antykoagulacyjne nad prokoagulacyjnymi [15]. Tlenek azotu i prostacyklina oprócz działań wazodylatacyjnych, hamują przyleganie płytek krwi do śródbłonka oraz aktywują neutrofile i makrofagi [15].

Komórki śródbłonka produkują trombomodulinę, kofaktor w aktywacji białka C, wiążący się z czynnikiem V oraz VIII [12, 15]. Antytrombina III, glikoproteina wytwarzana w wątrobie, ma istotne działanie antykoagulacyjne, gdyż hamuje osoczowe czynniki krzepnięcia. Jej działanie wspomagane jest przez glikozaminoglikany na powierzchni

śródbłonna, które zawierają reszty heparynopodobne i nasilają aktywność przeciwzakrzepową antytrombiny [15].

Komórki śródbłonna mają silne działanie fibrynolityczne, które zapewnia im tkankowy Aktywator Plazminogenu (ang. *tissue Plasminogen Activator*, t-PA) [14], przekształcając plazminogen w plazminę. W warunkach fizjologicznych aktywatory plazminogenu przeważają nad inhibitorami fibrylizy, do których zalicza się Inhibitory Aktywatorów Plazminogenu (ang. *Plasminogen Activator Inhibitor 1,2,3*, - PAI) [15].

Dodatkowo śródbłonek może produkować Czynniki von Willebranda (ang. *von Willebrand Factor*, vWF), glikoproteinę, która pośredniczy w przyleganiu płytek krwi do śródbłonna oraz transportuje czynnik krzepnięcia VIII [12, 15].

### **1.1.3. Cytokiny i cząsteczki adhezyjne**

Komórki śródbłonna naczyniowego w odpowiedzi na uszkodzenie mogą wytwarzać cytokiny zapalne, do których należą: Interleukina-6 (IL-6), Interleukina-8 (IL-8), Czynniki Martwicy Guza- $\alpha$  (ang. *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) oraz chemokiny, jak np. Czynniki Chemotaktyczne dla Monocytów-1 (ang. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*, MCP-1).

W odpowiedzi na mediatory stanu zapalnego śródbłonek naczyniowy może wykazywać ekspresję molekuł adhezyjnych takich jak: Naczyniowa Cząsteczka Adhezyjna (ang. *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*, VCAM-1), Międzykomórkowa Cząsteczka Adhezyjna (ang. *Intercellular Adhesion Molecule-1*, ICAM-1), Cząsteczka Adhezyjna Komórek Śródbłonna dla Leukocytów (ang. *Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule*, ELAM) oraz selektyny: śródbłonkowa (E-selektyna) i płytkowa (P-selektyna) [9, 12]. Prowadzi to do nasilenia komórek odpowiedzi zapalnej w ścianie naczyń oraz istotnie przyspiesza rozwój miażdżycy [9, 12, 20].

Produkowane przez śródbłonek Czynniki Wzrostu Śródbłonka Naczyń (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) oraz Płytkowy Czynniki Wzrostu (ang. *Platelet Derived Growth Factor*, PDGF) uczestniczą w zjawisku angiogenezy [9, 15].

## 1.2. Ocena funkcji śródbłonka naczyniowego

W chwili obecnej dostępne są biochemiczne oraz biofizyczne metody oceny funkcji śródbłonka naczyniowego. Biochemiczne metody oceny czynności śródbłonka naczyniowego oceniają syntezę związków wytwarzanych przez śródbłonek naczyniowy, zarówno prawidłowy, jak również uszkodzony. Do metod biochemicznych zaliczyć można: określanie stężenia Czynnika von Willebranda, tkankowego Aktywatora Plazminogenu, Inhibitora Aktywatora Plazminogenu-1, cząsteczek adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1), trombomoduliny, E-selektyny, P-selektyny, Czynnika Wzrostu Śródbłonka Naczyń [12, 21-24].

NO jest wysoce niestabilny, jego czas półtrwania wynosi zaledwie kilka sekund, dlatego też bardzo trudne jest wykonanie bezpośrednich pomiarów. Ilość NO produkowanego endogennie można określić za pomocą dwóch metod: pomiarów osocznego stężenia azotynów/azotanów, produktów przemiany NO oraz pomiarów NO w wydychanym powietrzu [25, 26].

Wśród metod biochemicznych należałoby również wymienić ilościowe oznaczanie krążących śródbłonkowych komórek progenitorowych metodą cytometrii przepływowej [27].

Do metod biofizycznych zaliczyć należy: ocenę reaktywności tętnicy ramiennej w odpowiedzi na niedokrwienie (ang. *flow-mediated dilatation*, FMD) [28], ocenę wielkości odpływu żylnego i napływu tętniczego przy użyciu pletyzmografii impedancyjnej [3], analizę fali tętna (ang. *pulse wave analysis*, PWA) oraz ocenę propagacji fali tętna (ang. *pulse wave velocity*, PWV) [29].

Ocena reaktywności tętnicy ramiennej w odpowiedzi na niedokrwienie polega na ultrasonograficznym określeniu stopnia rozszerzenia tętnicy ramiennej po uprzednim całkowitym jej zamknięciu za pomocą mankietu ciśnieniomierza. Wyniki uzyskiwane przy użyciu tej metody są prawie całkowicie zależne od aktywności syntazy NO, korelują z funkcją śródbłonna naczyniowego większości tętnic [12, 30].

### **1.3. Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego**

Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego powoduje utratę wieloczynnikowej równowagi, którą zapewniają jego komórki, wytwarzając substancje naczynioskurczowe i naczyniorozkurczowe [31]. Zaburzenie czynności śródbłonna wiąże się z obniżonym potencjałem wazodylatacyjnym [16], a zwłaszcza ze zmniejszeniem biodostępności tlenu azotu w wyniku zmniejszenia jego syntezy lub inaktywacji jako konsekwencji zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) [31, 32].

Aktywowany śródbłonek charakteryzuje się wzrostem stężenia Czynnika von Willebranda, tkankowego Aktywatora Plazminogenu i jego inhibitora typu 1 oraz zwiększeniem ekspresji cząstek adhezyjnych [32]. Obserwuje się wzrost aktywności prozapalnej [16], adhezji i agregacji leukocytów oraz płytek krwi [32], proliferacji komórek mięśniówki naczyń [14].

Wymienione powyżej procesy pełnią kluczową rolę w powstawaniu i narastaniu blaszki miażdżycowej oraz przyczyniają się do jej destabilizacji, co może w konsekwencji doprowadzić do wystąpienia udaru mózgu, ostrych zespołów wieńcowych, a także chorób naczyń obwodowych [14, 32, 33].

#### **1.4. Wpływ hemodializy na dysfunkcję śródbłónka naczyniowego**

Mechanizmy, które uszkadzają śródbłonek naczyniowy podczas hemodializy, przyczyniają się do zmniejszonej produkcji NO i obniżenia zdolności rozkurczowej śródbłónka [8, 25], powstania stresu oksydacyjnego oraz stanu zapalnego [8, 34, 35]. Wśród patomechanizmów uszkadzających śródbłonek w trakcie hemodializy należałoby wymienić również: wzrost stężenia endoteliny-1, asymetrycznej dimetyloargininy [8], zaburzenia gospodarki lipidowej [22, 36] oraz hiperhomocysteinemię [8].

Meyer i wsp. stwierdzili nieprawidłową funkcję śródbłónka naczyniowego u pacjentów hemodializowanych, badając wazodylatację tętnicy ramiennej w odpowiedzi na niedokrwienie [33].

##### **1.4.1. Wpływ hemodializy na czynność rozkurczową śródbłónka naczyniowego**

Istnieją rozbieżności co do oceny stężenia tlenu azotu u pacjentów hemodializowanych. W części wykonanych badań stwierdzono obniżone stężenia NO [25], w innych zaś podwyższone stężenia NO w wydychanym powietrzu po hemodializie w porównaniu z pomiarami przed hemodializą [26, 37]. Wykazano obniżone wartości azotynów/azotanów po hemodializie, jednakże zgodnie z opinią Raj i wsp. oraz Sumino i wsp. nie są one adekwatnym markerem do oceny produkcji NO, gdyż są one efektywnie usuwane podczas hemodializy [25, 26]. Errakonda i wsp. stwierdzili obniżone wartości azotanów, jednakże po skorygowaniu ze stężeniami kreatyniny, podwyższone wartości azotanów, co potwierdziłoby zwiększoną produkcję NO [8]. Mimo, iż podczas hemodializy dochodzi do aktywacji cytokin i wzrostu produkcji NO, stężenie tlenu azotu może być obniżone ze względu na zwiększoną jego degradację, zmniejszenie aktywności syntazy NO, podwyższone osoczowe stężenie ADMA, obniżoną biodostępność L-argininy oraz usuwanie metabolitów NO podczas procesu hemodializy [26, 33].

Meyer i wsp. badali wpływ indukowanej hemodializą wewnątrznaczyniowej hemolizy na bioaktywność tlenku azotu oraz dysfunkcję śródbłonka u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek. Stwierdzili, iż nawet pojedynczy zabieg hemodializy doprowadza do wzrostu hemolizy, oddzielenia hemoglobiny od krwinek czerwonych oraz wzrostu stężenia wolnej hemoglobiny w osoczu [33]. W tym badaniu nieprawidłowa reaktywność tętnicy ramiennej w odpowiedzi na niedokrwienie była zależna od stężenia wolnej hemoglobiny [33]. W wyniku hemolizy dochodzi do uwalniania hemoglobiny z erytrocytu, co pozwala na przedostawanie się hemoglobiny w okolice komórek śródbłonka i strefy podśródbłonkowej, miejsca, gdzie wytwarzany jest NO. Wolna hemoglobina ma prawie 1000-krotnie większą, w porównaniu z hemoglobina znajdującą się w erytrocycie, zdolność wychwytywania NO. Najważniejszą reakcją zachodzącą pomiędzy NO a hemoglobina jest dioksygenacja z utlenowaną hemoglobina (oksyhemoglobina), w wyniku której powstaje methemoglobina oraz anion azotanowy [33, 38]. Reakcja pomiędzy hemoglobina a NO jest nieodwracalna oraz szybka i nawet niewielka ilość wolnej hemoglobiny może całkowicie związać śródbłonkowy NO i doprowadzić do dysfunkcji śródbłonka [33, 38].

Hemoliza prowadzi także do uwalniania arginazy-1, wewnątrzkomórkowego enzymu, który podczas gdy znajduje się w osoczu, jest zdolny do reakcji z L-arginina i produkcji ornityny. Powoduje to obniżenie dostępności L-argininy do konwersji w tlenek azotu przez syntazę NO [38, 39].

Obecnie istnieją sprzeczne opinie na temat stężeń ADMA u pacjentów hemodializowanych. Raj i wsp. stwierdzili podwyższone wartości ADMA przed i po dializie, co może prowadzić do zahamowania produkcji NO, jednakże wykazano także wzrost stosunku L-argininy/ADMA po zabiegu hemodializy, co z kolei przyczynić się może do zwiększenia syntezy NO [26]. Errakonda i wsp. zaobserwowali obniżenie stężenia ADMA po hemodializie oraz zwiększenie wskaźnika L-arginina/ADMA [8].

Istnieją dowody, iż dysfunkcja śródbłónka naczyniowego może pełnić kluczową rolę w patogenezie pojawiającej się podczas hemodializy niestabilności hemodynamicznej. W odpowiedzi na bodźce mechaniczne oraz chemiczne, komórki śródbłónka naczyniowego produkują wiele aktywnych biologicznie substancji, w tym przede wszystkim NO oraz endotelinę-1 [26]. Zakłócenie równowagi między tymi czynnikami może prowadzić do zmian wartości ciśnienia tętniczego podczas hemodializy, co jest prawdopodobnie związane z indywidualną odpowiedzią na zmiany hemodynamiczne podczas oraz w okresie pomiędzy hemodializami [26].

#### **1.4.2. Hemodializa a stres oksydacyjny**

Stres oksydacyjny można zdefiniować jako brak równowagi pomiędzy produkcją reaktywnych form tlenowych a mechanizmami obronnymi [40, 41]. Reaktywne formy tlenu niekorzystnie wpływają na funkcję naczynia krwionośnego za pośrednictwem wielu mechanizmów. Mogą one uszkadzać śródbłonek naczyniowy, hamować śródbłonkową produkcję oraz działanie tlenku azotu prowadząc do nasilenia miażdżycy. Poza tym powodują one peroksydację składników lipidowych i formowanie się utlenowanych lipoprotein niskiej gęstości (ang. *low-density lipoprotein*, LDL), kluczowych mediatorów powstawania miażdżycy, które mogą również wpływać na biologiczną aktywność czynników rozkurczowych pochodzenia śródbłonkowego [3]. Do mechanizmów obronnych w walce z reaktywnymi formami tlenu zaliczyć można enzymy obecne wewnątrz erytrocytu, takie jak: peroksydaza glutationowa (ang. *glutathione peroxidase*, GSH-Px), reduktaza glutationowa (ang. *glutathione reductase*, GSH-Rx), dysmutaza nadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*, SOD) oraz występujące poza erytrocytem: witamina C, E,  $\beta$ -karoten, glutation i inne. Zaburzenia tych mechanizmów mogą doprowadzić do wystąpienia odczynu zapalnego, hemolizy oraz miażdżycy [8].

Główne czynniki przyczyniające się do powstania stresu oksydacyjnego podczas hemodializy to: wymuszony przepływ krwi przez powierzchnię bioniezgodnej błony dializacyjnej, skażenie płynu dializacyjnego przez bakterie i ich produkty oraz kwas moczowy i inne metabolity usuwane podczas hemodializy [5, 34].

Udowodniono, iż nawet pojedynczy zabieg hemodializy znacząco zwiększa stężenie peroksydazy lipidowej oraz utlenionych LDL i obniża stężenie antyoksydantów [3, 8, 28]. Hemodializa nasila stres oksydacyjny, co przyczynia się do zwiększonej aterogenezy [3, 28]. Jednym z produktów peroksydacji lipidów jest malonyldialdehyd (ang. *malondialdehyde*, MDA), który został opisany przez Weinsteina i wsp. jako marker stresu oksydacyjnego [8]. W wykonanym przez Weinsteina badaniu, pacjenci hemodializowani charakteryzowali się podwyższonym stężeniem MDA, zaobserwowano również występowanie zależności pomiędzy wartościami MDA a ilością lat poddawania pacjentów zabiegom hemodializy. Weinstein i wsp. stwierdzili także zmniejszone stężenie glutationu, reduktazy glutationowej oraz podwyższone stężenie peroksydazy glutationowej u pacjentów hemodializowanych [8]. Pacjenci z niższymi poziomami glutationu byli narażeni na większe ryzyko hemolizy związanej ze skażeniem chloraminą płynu dializacyjnego [8].

W przeprowadzonym przez Nguyen-Khoa i wsp. badaniu stwierdzono podwyższone stężenia w surowicy chorych leczonych hemodializą markerów utlenienia tłuszczów: substancji reaktywnych kwasu tiobarbiturowego (ang. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) oraz utlenienia białek: produktów zaawansowanego utlenienia białek (ang. *advanced oxidation protein products*, AOPP) [41]. Oceniając mechanizmy obronne skierowane przeciwko stresowi oksydacyjnemu wykazano obniżenie aktywności erytrocytowej dysmutazy ponadtlenkowej (ang. *Cu/Zn superoxide dismutase*, Cu-Zn-SOD), kluczowego enzymu bariery antyoksydacyjnej organizmu. Nie zaobserwowano różnicy w stężeniach GSH pomiędzy pacjentami poddawanyymi hemodializom a grupą kontrolną, jednakże stwierdzono



podwyższony stosunek utlenionego glutationu do zredukowanego glutationu. Poziom aktywności GSH-Px oraz GSH-Rx oceniany w osoczu był znacząco niższy w grupie pacjentów hemodializowanych [41]. Valentini i wsp. stwierdzili podwyższone stężenia zarówno substancji reaktywnych z kwasem tiobarbiturowym oraz malondialdehydu, zwrócili jednak uwagę na fakt, iż malondialdehyd jest bardziej czułym i swoistym markerem w porównaniu z substancjami reaktywnymi z kwasem tiobarbiturowym [42]. W badaniu tym oceniano również aktywność dehydratazy  $\delta$ -aminolewulinowej (ang. *aminolevulinic acid dehydratase*, ALA-D), enzymu wrażliwego na sytuacje związane z występowaniem stresu oksydacyjnego. Wykazano zmniejszony poziom aktywności ALA-D oraz zwiększony indeks reaktywacji ALA-D, co może wiązać się z nadprodukcją wolnych rodników [42].

#### **1.4.3. Hemodializa a występowanie stanu zapalnego**

Do indukcji stanu zapalnego podczas hemodializy przyczynić się mogą: nadmierna ekspresja molekuł adhezyjnych [22, 24], uwalnianie czynników chemotaktycznych dla komórek stanu zapalnego [24], a także produkcja Inhibitora Aktywatora Plazminogenu-1 [21, 22].

Nguyen-Khoa i wsp. zasugerował, iż stan zapalny oraz czas trwania dializy są najistotniejszymi czynnikami wpływającymi na występowanie stresu oksydacyjnego u pacjentów hemodializowanych [41]. Wykazano podwyższone stężenia białka C-reaktywnego (ang. *C-reactive protein*, CRP), które korelowały ze stężeniami produktów peroksydacji lipidów oraz reaktywnych substancji kwasu tiobarbiturowego. Wyniki te sugerują, iż stan zapalny może indukować zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu, a następnie doprowadzić do zużycia rozpuszczalnych w tłuszczach antyoksydantów. Tak więc stan zapalny oraz stres oksydacyjny mogą tworzyć zamknięte koło prowadząc do nasilonego rozwoju miażdżycy [41]. Inne badania przeprowadzone na grupie hemodializowanych dzieci

wykazały, iż leczenie hemodializami wiąże się ze zwiększoną ostrą odpowiedzią zapalną pod postacią wzrostu stężenia TNF- $\alpha$  oraz Interlukiny-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (cytokin wczesnej odpowiedzi zapalnej), natomiast nie ma wpływu na stężenie Interleukiny-6 (IL-6) oraz Interleukiny-10 (IL-10) (cytokin późnej odpowiedzi zapalnej) [35]. Stwierdzono, iż obserwowane wysokie wartości CRP wskazują na obecność przewlekłego stanu zapalnego związanego prawdopodobnie z obecnością mocznicy u chorych hemodializowanych [8, 35]. Kunz i wsp. wykazali podwyższone stężenia fibrynogenu w grupie pacjentów hemodializowanych w porównaniu z grupą kontrolną [21].

Kolejnym markerem stanu zapalnego ocenianym przez Errakonda i wsp. była aktywność fosfolipazy A2 związanej z lipoproteiną (ang. *lipoprotein-associated phospholipase A2*, Lp-PLA2), enzymu związanego z utlenieniem lipidów, co do którego udowodniono, iż uczestniczy w powstawaniu stanu zapalnego, dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, a w konsekwencji prowadzi do nasilonego rozwoju miażdżycy [8]. Errakonda i wsp. wykazali znacząco podwyższoną aktywność tego enzymu u chorych hemodializowanych [8].

Zwiększona produkcja cytokin prozapalnych powoduje aktywację molekuł adhezyjnych, takich jak: Naczyniowa Częsteczka Adhezyjna-1 oraz Międzykomórkowa Częsteczka Adhezyjna-1 [24]. Również zmniejszona biodostępność NO przyczynia się do nasilonej ekspresji VCAM-1, co w konsekwencji generuje wzrost stężenia reaktywnych form tlenu oraz CRP. VCAM-1 wykazuje powinowactwo z limfocytami T, inicjując w ten sposób reakcję zapalną w ścianie naczynia [16]. Chemotaktyczną cytokiną, wydzielaną przez śródbłonek naczyniowy pod wpływem ekspozycji na inne cytokiny takie jak Interleukina 1 $\beta$ , Czynniki Martwicy Guza- $\alpha$  oraz utlenione lipoproteiny, jest Białko Chemotaktyczne dla Monocytów [24]. Deficyt NO przyczynia się do zwiększonej ekspresji MCP-1, chemokiny przyciągającej makrofagi [16]. Makrofagi, gromadząc nadmiar utlenionych LDL,

przekształcają się w komórki piankowate, a następnie po samodestrukcji tych komórek dochodzi do powstania rdzenia lipidowego blaszki miażdżycowej. TNF- $\alpha$  na drodze szlaków sygnałowych przyczynia się do zwiększonego rozpadu matrycowego RNA (ang. *messenger RNA*, mRNA) dla izoformy e-NOS, zmniejszając w ten sposób syntezę NO [16].

Stwierdzono podwyższone stężenia ICAM-1, VCAM-1 [22, 24] oraz MCP-1 [24] w grupie chorych hemodializowanych w porównaniu z grupą kontrolną niezależnie od rodzaju zastosowanej błony dializacyjnej. Zwiększone wartości molekuł adhezyjnych związane były z obecnością stanu zapalnego [24].

#### **1.4.4. Inne czynniki związane z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego u chorych hemodializowanych**

Morena i wsp. potwierdzili, iż chorzy hemodializowani są narażeni na ilościowe oraz funkcjonalne zaburzenia w zakresie gospodarki lipidowej włączając: wysokie stężenia triglicerydów, zwiększoną wrażliwość na utlenienie LDL oraz nieprawidłową funkcję ochronną lipoprotein wysokiej gęstości (ang. *high density lipoprotein*, HDL) [36]. Bolton i wsp. stwierdził także obniżone wartości HDL oraz podwyższone wartości triglicerydów w grupie pacjentów hemodializowanych [22]. Czynniki te mogą wpływać na rozwój związanej z hemodializą miażdżycy. Miyazaki i wsp. wykazał znacząco wyższe stężenia utlenionych LDL po pojedynczym zabiegu hemodializy [28].

W przeprowadzonych badaniach wykazano, iż hemodializowani chorzy charakteryzują się wysokimi stężeniami homocysteiny, co może wiązać się ze zwiększonym utlenieniem LDL [21, 43]. Zwiększone wartości homocysteiny są niezależnym czynnikiem zwiększonego ryzyka zgonu z powodu schorzeń układu sercowo-naczyniowego [21, 43]. Jednakże Errakonda i wsp. stwierdzili obniżone stężenie homocysteiny, będące dodatkowym czynnikiem pobudzającym produkcję NO, gdyż homocysteina hamuje syntazę NO [8].

Spośród innych, przypuszczalnych markerów dysfunkcji śródbłonka naczyniowego należałoby wymienić: Czynniki von Willebranda, tkankowy Aktywator Plazminogenu, Inhibitor Aktywatora Plazminogenu-1. Wykazano znacząco wyższe stężenia t-PA, PAI-1, vWF [21,22] oraz rozpuszczalnego antygenu vWF [23] w grupie chorych hemodializowanych.

W zdrowym organizmie warstwa śródbłonka jest stale odnawiana na niskim poziomie replikacji rzędu 0-1%/dzień, tak więc wykrycie krążących komórek śródbłonka (ang. *circulating endothelial cells*, CEC) w zdrowym dorosłym organizmie należy do rzadkości [44]. Podwyższone stężenia krążących komórek śródbłonka, które mogą występować w wielu sytuacjach klinicznych, takich jak na przykład nadciśnienie, hiperlipidemia, stres oksydacyjny, mogą odzwierciedlać stopień uszkodzenia śródbłonka naczyniowego [45]. Koc i wsp. stwierdzili podwyższone średnie wartości krążących komórek śródbłonka u chorych hemodializowanych w porównaniu z grupą kontrolną [46]. Krążące komórki śródbłonka są wskaźnikiem uszkodzenia śródbłonka naczyniowego. Uważa się, iż komórki progenitorowe śródbłonka naczyniowego (ang. *endothelial progenitor cells*, EPC) odzwierciedlają zdolności naprawcze śródbłonka [45]. Komórki te pochodzą ze szpiku kostnego i mogą różnicować się w komórki śródbłonka naczyniowego. Weserweel i wsp. stwierdził, iż hemodializa indukuje apoptozę komórek progenitorowych śródbłonka naczyniowego oraz powoduje ich wyczerpanie [47]. Jednakże Jourde-Chiche i wsp. wykazał dodatnią zależność między pochodzącymi ze szpiku komórkami progenitorowymi śródbłonka a wskaźnikami uszkodzenia naczyń w postaci prędkości fali tętna aorty oraz stężeniami mikrocząsteczek z komórek śródbłonka (ang. *endothelial microparticles*, EMP) u chorych hemodializowanych. Wyniki te sugerują, iż pomimo obniżonych wartości komórek progenitorowych śródbłonka spowodowanych chorobą nerek, uszkodzenie naczyń może przyczynić się do stymulacji mobilizacji komórek progenitorowych [48].

Mikrocząsteczki z komórek śródbłonna są błonowymi fragmentami uwalnianymi przez komórki śródbłonna pod wpływem uszkodzenia lub apoptozy [48-50]. Stwierdzono podwyższone stężenia tych mikrocząsteczek u chorych hemodializowanych [49, 50], które odwrotnie korelują z poszerzeniem tętnicy ramiennej w odpowiedzi na niedokrwienie [50].

#### **1.4.5. Hemodializa a występowanie zwapnień w naczyniach krwionośnych**

Obecność zwapnień i zmian miażdżycowych w naczyniach wieńcowych jest istotnym czynnikiem rokowniczym wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek [51, 52]. Wykazano obecność zwapnień w ścianie naczyń wieńcowych ocenianych za pomocą tomografii komputerowej [51, 53, 54]. Zaobserwowano ścisłą zależność pomiędzy zwapnieniami w naczyniach wieńcowych, grubością kompleksu *intima-media* oraz obecnością i wielkością blaszki miażdżycowej u chorych hemodializowanych [52]. Obserwowane zwapnienia blaszki miażdżycowej oraz błony środkowej, mogą wiązać się z nadciśnieniem, czasem trwania hemodializy, doustną suplementacją wapnia i zaburzeniami homeostazy fosforanów wapnia [53, 55]. W chwili obecnej istnieją różne teorie co do przyczyny występowania zwapnień w naczyniach u chorych hemodializowanych (zabieg hemodializy, choroba nerek czy oba te czynniki jednocześnie). Zmiany stężeń jonów, takich jak wapń, potas czy magnez, aktywacja reniny oraz układu współczulnego czy też objętości usuwanych podczas hemodializy płynów mogą odpowiadać za zwiększone występowanie zwapnień [56]. Cohen i wsp. zaobserwowali podwyższone wartości wapnia w osoczu krwi na początku oraz na końcu hemodializy, zwiększony systemowy opór naczyniowy, a także zmniejszenie podatności małych naczyń [56].

#### **1.4.6. Wpływ użytej błony dializacyjnej na dysfunkcję śródbłonka naczyniowego**

W ostatnich latach zbadano wpływ rodzaju użytej błony dializacyjnej (jej biozgodności) na funkcję komórek śródbłonka naczyniowego. Matsuoka ultrasonograficznie mierzył wazodylatację tętnicy ramiennej w odpowiedzi na niedokrwienie aby ocenić funkcję śródbłonka naczyniowego [3]. Określał także stężenia w osoczu utlenionych LDL przed i po pojedynczej sesji hemodializy z użyciem celulozowej błony dializacyjnej pokrytej witaminą E. Witamina E zmniejszała stres oksydacyjny indukowany przez aktywowane na powierzchni błony dializacyjnej leukocyty wielojądrzaste. Stwierdził, iż hemodializa przeprowadzona za pomocą błony dializacyjnej pokrytej witaminą E chroni przed uszkodzeniem śródbłonka oraz wzrostem stężenia utlenionych LDL [3]. Badanie to potwierdziło tezę wysuniętą uprzednio przez Miyazaki i wsp. [28]. W innym badaniu stwierdzono, iż stosowanie błony dializacyjnej pokrytej witaminą E wiązało się ze znaczącym wzrostem stężenia HDL oraz zmniejszonym utlenieniem LDL [57].

Wykazano, iż celulozowa błona dializacyjna w porównaniu z polisulfonową wywołuje większy stres oksydacyjny i wpływa niekorzystnie na funkcję granulocytów [58]. Podczas gdy hemodializa per se z użyciem błony polisulfonowej nie ma wpływu na rozkurcz tętnicy ramiennej w odpowiedzi na niedokrwienie [59, 60], hemodializa z użyciem błony celulozowej związana jest z istotnym zmniejszeniem funkcji śródbłonka naczyniowego [59]. Dysfunkcja śródbłonka naczyniowego obserwowana przy użyciu celulozowej błony dializacyjnej wiąże się także z obniżonym stężeniem  $\alpha$ -tokoferolu (witaminy E) w surowicy chorych hemodializowanych, co może świadczyć o zwiększonym stresie oksydacyjnym [59].

Wpływ hemodializy na strukturę i funkcję komórek śródbłonka naczyniowego nie jest nadal w pełni wyjaśniony. Z jednej strony wykazano upośledzenie funkcji śródbłonka naczyniowego w tętnicy ramiennej po hemodializie [3, 28, 33], z drugiej zaś strony zaobserwowano poprawę funkcji żylnego śródbłonka naczyniowego. Wiąże się to z

usuwaniem podczas hemodializy wewnętrznych inhibitorów syntazy NO, które akumulują się w organizmie chorych ze schyłkową niewydolnością nerek [61, 62].

Ocena wpływu hemodializy na śródbłonek naczyniowy oraz określenie czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego wymaga dalszych badań.

W związku z ogromną rolą śródbłonka naczyniowego w utrzymaniu homeostazy naczyniowej istotna jest ocena bezpośredniego wpływu zabiegu hemodializy na funkcję komórek śródbłonka naczyniowego. Do tej pory nie przeprowadzono badań oceniających, w jaki sposób zmiana właściwości surowicy wynikająca z procesu hemodializy wpływa na funkcję śródbłonka.

## 2. CEL PRACY

Celem pracy była ocena zmiany składu surowicy podczas zabiegu hemodializy i jej potencjalnego wpływu na czynność komórek śródbłonka.

Cele te zrealizowano badając szczegółowo poniższe problemy:

- I. Ocena wybranych parametrów odczynu zapalnego, stresu oksydacyjnego oraz produktów metabolizmu tlenu azotu w surowicy chorych dializowanych.
- II. Ocena wpływu surowicy chorych dializowanych na czynność komórek śródbłonka w hodowli *in vitro*.



### **3. MATERIAŁ I METODA**

Badanie przeprowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu. Każdy chory uczestniczący w badaniu zapoznał się z informacją o przebiegu i celu projektu, a następnie pisemnie wyraził świadomą zgodę na udział.

#### **3.1. Badani chorzy**

Badaniem objęto 42 chorych leczonych przewlekłymi hemodializami z powodu schyłkowej niewydolności nerek w Stacji Dializ Szpitala Powiatowego w Inowrocławiu (w wieku  $63 \pm 16$  lat, 29 mężczyzn (69%) i 13 kobiet (31%)). 29 pacjentów hemodializowano przy użyciu przetoki tętniczo-żylniej, pozostałych 13 za pomocą cewnika dializacyjnego.

#### **3.2. Schemat hemodializy**

Badani chorzy byli dializowani 2-3 razy w tygodniu, od 3,5 do 5 godzin (czas ustalany indywidualnie, zależnie od stanu klinicznego, diurezy resztkowej oraz wskaźników skuteczności dializy). Do hemodializy używano dwuwęglanowego płynu dializacyjnego. Przepływ krwi przez dializator zależny był od wydolności hemodynamicznej dostępu naczyniowego, wynosił 200-300 ml/min. Używano niereużytych dializatorów kapilarnych z błoną polisulfonową firmy Fresenius Hemoflow F7HPS, F8HPS, F10HPS. Stosowano aparaty Dialog firmy Braun oraz Fresenius 4008 S i 4008 B, przepływ dializatu wynosił standardowo 500 ml/min.

#### **3.3. Materiał do badań**

U wszystkich chorych uczestniczących w badaniu w celu wykonania podstawowych oznaczeń laboratoryjnych pobierano krew żylną przed drugą dializą w tygodniu. Oznaczano:

morfologię, lipidogram (cholesterol całkowity, frakcja HDL, LDL oraz triglicerydy), stężenia elektrolitów, glukozy, białka C-reaktywnego, białka całkowitego i albumin, żelaza, transferyny, ferrytyny, fosfatazy zasadowej, transaminaz oraz parathormonu. Jako materiał do eksperymentu pobierano krew na skrzep przed i po zakończeniu drugiej hemodializy w tygodniu. Uzyskaną próbkę krwi odwirowywano, jałowo oddzielano i porcjowano surowicę. Do czasu wykonania oznaczeń próbki surowicy przechowywano w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Do przeprowadzanych eksperymentów wykorzystywano świeżo rozmrożone porcje.

### **3.4. Hodowla komórkowa**

Eksperymenty wykonywano na pierwotnej hodowli komórek śródbłonkowych pochodzących z ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC, Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Komórki zawieszano w medium hodowlanym firmy GIBCO Invitrogen Life Technologies (Wielka Brytania), zawierającym gentamycynę i amfoterycynę B ( $5\ \mu\text{g/ml}$ ), Naskórkowy Czynniki Wzrostu (ang. *Epidermal Growth Factor*, EGF) ( $5\ \mu\text{g/ml}$ ), hydrokortyzon ( $1\ \text{mg/ml}$ ) oraz zasadowy Czynniki Wzrostu Fibroblastów (ang. *basic Fibroblast Growth Factors*, bFGF) ( $1,5\ \mu\text{g/ml}$ ), heparynę ( $5\ \text{mg/ml}$ ), surowiczą albuminę bydlęcą (ang. *bovine serum albumin*, BSA) ( $100\ \mu\text{g/ml}$ ). Hodowla komórkowa prowadzona była w butelkach hodowlanych (Nunc, S/A Dania) o pojemności  $25\ \text{cm}^3$ , w warunkach standardowych, tj. w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ , w nawilżonym powietrzu zawierającym 5%  $\text{CO}_2$ . Wymiany medium dokonywano co 3 dni, do momentu uzyskania warstwy zlewnej komórek. Następnie komórki złuszczano po uprzednim zebraniu medium, wykorzystując roztwór 0,05% trypsyny firmy SIGMA Aldrich (Niemcy) oraz posiewano do 48-studzienkowych płytek hodowlanych (Nunc, S/A Dania).

Doświadczenia wykonywano na zlewnych warstwach komórek śródbłonka (ocena generacji wolnych rodników) lub na komórkach w fazie wzrostu wykładniczego (ocena

proliferaacji komórek). Poszczególne eksperymenty wykonywano według metodyki opisanej poniżej.

### **3.4.1. Ocena proliferacji komórek śródbłonka**

Komórki śródbłonka posiewano na 24-studzienkowe płytki hodowlane z gęstością  $5 \times 10^4$  komórek/studzienkę. Po 12 godzinach medium hodowlane usuwano ze studzienek i zastępowano płynami hodowlanymi z dodatkiem  $^3\text{H}$ -metyl-tymidyny (Institute of Radioisotopes, Praga, Czechy) w stężeniu 1 uCi/ml. Do studzienek dodawano 200  $\mu\text{l}$  surowicy uzyskanej od każdego chorego, przed i po zabiegu hemodializy, co dawało zawartość badanych surowic w każdej ze studzienek równą 20% objętości. Każda próbka surowicy była badana sześciokrotnie.

Po 24 godzinnej inkubacji supernatant usuwano ze studzienek, komórki płukano roztworem Hanksa bez jonów wapnia i magnezu, a następnie trypsynizowano roztworem 0,05% trypsyny z 0,02% EDTA. Uzyskaną zawiesinę dwukrotnie precypitowano stosując kolejno 10% i 20% roztwór kwasu trójchlorooctowego. Następnie po dodaniu 0,1 N NaOH uzyskano lizat, którego radioaktywność mierzono przy użyciu licznika promieniowania  $\beta$ : Rackbeta 1209 (LKB Wallac/Perkin Elmer, Finlandia). Natężenie promieniowania proporcjonalne do wielkości inkorporacji znakowanej tymidyny uznawano jako wykładnik proliferacji komórkowej. Wyniki przedstawiono jako ilość impulsów zliczoną w czasie 1 minuty (ang. *counts per minute*, CPM).

### **3.4.2. Generacja wolnych rodników w komórkach śródbłonka**

Eksperymenty były wykonywane na zlewnej warstwie komórek śródbłonka w 24-studzienkowych płytkach hodowlanych. Komórki były eksponowane na medium hodowlane z dodatkiem badanych surowic pochodzących od indywidualnych chorych, uzyskanych przed

lub po zabiegu hemodializy. Badane surowice dodawano do studzienek w takiej ilości, aby ich ostateczne stężenie w roztworze było równe 20%. Każda surowica była badana sześciokrotnie. Po 24 godzinach ekspozycji na medium hodowlane z dodatkiem badanych surowic w stężeniu 20% oceniano wielkość generacji wolnych rodników wewnątrz komórek.

Oznaczenie wewnątrzkomórkowej generacji wolnych rodników przeprowadzono za pomocą dwuocianu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DDF), który w obecności wolnych rodników przechodzi w 2',7'-dichlorodihydrofluoresceinę (DF), źródło fluorescencji. Po zakończeniu 24-godzinnej ekspozycji na badane media, przez okres następnych 45 minut komórki były inkubowane w medium hodowlanym z dodatkiem DDF, a następnie poddawane lizie 0,1N NaOH. Fluorescencja emitowana przez uzyskane lizaty komórkowe była mierzona w spektrofotometrycznej (Wallac-Victor, Perkin-Elmer, Turku, Finland) przy fali wzbudzenia 485 nm i fali emisji 535 nm. Uzyskane wyniki są przedstawione w arbitralnych jednostkach przeliczonych na ilość białka komórkowego.

Dla oznaczenia stężenia białka całkowitego zastosowano metodę Lowry'ego w lizacie komórek w 96-dółkowych płytkach polistyrenowych. Używano zestawu reagentów (BIO-RAD Laboratories, Niemcy): reagent A (zasadowy winian miedziowy), tworzący z reagentem S reagent A', oraz reagent B (reagent Folina). Do przygotowania krzywej wzorcowej zastosowano roztwór 1mg/ml albuminy w seryjnych rozcieńczeniach (5, 10, 20, 30, 40 µg/ml). Próbę rozcieńczano 3-5-krotnie, następnie do każdej studzienki umieszczano pobrane pipetą 5 µl próby oraz wzorca. Kolejno do studzienek wprowadzono 25 µl reagentu A' oraz 200 µl reagentu B. Odczyt wykonywano wobec próby ślepej przy długości fali 750 nm na spektrofotometrycznej (VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, LLC, USA)). Stężenie białka w badanych próbkach odczytywano z krzywej wzorcowej.

### **3.4.3. Synteza cytokin prozapalnych przez komórki śródbłonna**

Zlewną warstwę komórek śródbłonna w 24-studzienkowych płytkach hodowlanych poddawano 24-godzinnej ekspozycji na medium hodowlane z dodatkiem badanych surowic o stężeniu 20%. Surowice uzyskano od chorych przed oraz po zabiegu hemodializy. Po zakończeniu inkubacji ze wszystkich studzienek zebrano supernatant jako materiał do dalszych badań, w pobranych próbkach oznaczano stężenie IL-6 i MCP-1. Następnie komórki śródbłonna poddano lizie z użyciem 0,1 N NaOH oraz oznaczano białko komórkowe według metody Lowry'ego opisaną powyżej. Syntezę cytokin IL-6 oraz MCP-1 przez komórki śródbłonna wyrażono w jednostkach przeliczonych na ilość białka komórkowego.

## 4. OCENA REAKCJI ZAPALNEJ I STRESU OKSYDACYJNEGO

### 4.1. Interleukina-6 (IL-6)

Stężenie IL-6 w próbkach surowicy pobranej od badanych chorych oraz supernatancie pochodzącym z hodowli komórek śródbłonna oceniano wykorzystując test immunoenzymatyczny ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*, test immunoenzymosorbcyjny) typu *sandwich* wykorzystując zestaw do oznaczeń DuoSet ELISA Development System (R&D Systems, Wielka Brytania). Czulość metody wynosiła 0,7 pg/ml. Pomiar wykonywano za pomocą spektrofotometru VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, LLC, USA) przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm. Stężenie IL-6 w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej.

### 4.2. Białko Chemotaktyczne dla Monocytów (ang. *Monocyte Chemotactic Protein-1, MCP-1*)

Stężenie MCP-1 w próbkach surowicy pobranej od badanych chorych oraz supernatancie z hodowli komórek śródbłonna określano za pomocą metody ELISA (test immunoenzymosorbcyjny) wykorzystując zestaw DuoSet ELISA Development System (R&D Systems, Wielka Brytania). Oznaczenia przeprowadzano z użyciem płytek, które opłaszczono w trakcie wykonywania doświadczeń specyficznymi przeciwciałami dla ludzkiego MCP-1. Pomiar wykonywano wobec próby ślepej przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm, na spektrofotometrze VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, LLC, USA). Stężenie MCP-1 w badanych próbkach odczytywano na podstawie krzywej wzorcowej. Czulość metody wynosiła 5 pg/ml.

#### **4.3. Czynniki Wzrostu Śródbłonka Naczyń (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF)**

Stężenie VEGF w próbkach surowicy pobranej od badanych chorych mierzono za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA typu *sandwich* (R&D Systems, Wielka Brytania). Czulość metody wynosiła 13,5 pg/ml. Detekcję absorbancji przeprowadzono przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm, na spektrofotometrze VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, LLC, USA). Stężenie VEGF w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej.

#### **4.4. Czynniki Wzrostu Hepatocytów (ang. *Hepatocyte Growth Factor*, HGF)**

Stężenie HGF w próbkach surowicy pobranej od badanych chorych oznaczano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA typu *sandwich* (R&D Systems, Wielka Brytania). Czulość metody wynosiła 5,0 pg/ml. Pomiar wykonywano za pomocą spektrofotometru VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, LLC, USA) przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm. Stężenie HGF w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej.

#### **4.5. Asymetryczna dimetyloarginina (ang. *asymmetric dimethylarginine*, ADMA)**

Oznaczenia ADMA w próbkach surowicy pobranej od badanych chorych dokonano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (Immundiagnostik, Niemcy). Do pomiarów użyto płytki fabrycznie opłaszczonych poliklonalnymi przeciwciałami dla ADMA. Detekcję absorbancji przeprowadzono przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm, na spektrofotometrze VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, LLC, USA). Stężenie ADMA w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej. Czulość metody wynosiła 0,04  $\mu\text{mol/l}$ .

#### **4.6. Pentraksyna-3 (PTX-3)**

Stężenie PTX-3 w próbkach surowicy pobranej od badanych chorych mierzono za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (Uscn Life Science Inc, USA). Czulość metody wynosiła 0,128 ng/ml. Pomiary wykonano przy użyciu płytek fabrycznie opłaszczonych specyficznymi przeciwciałami dla PTX-3. Detekcję absorbancji przeprowadzono przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm, na spektrofotometrze VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, LLC, USA). Stężenie PTX-3 w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej.

#### **4.7. Białko karbonylowane**

Stężenie białka karbonylowanego w surowicy badanych chorych wykonywano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (Cell Biolabs Inc, USA). Pomiary wykonano przy użyciu płytek opłaszczonych specyficznymi przeciwciałami przeciwko DNP (2,4-dinitrofenol), na podstawie reakcji z DNPH (2,4-dinitrofenylohydrazyna). Pomiar absorbancji przeprowadzono przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 450 nm, na spektrofotometrze VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, LLC, USA). Stężenie białka karbonylowego w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej. Czulość metody wynosiła 2 nmol/mg białka.



#### **4.8. Azotyny/Azotany**

Stężenie tlenu azotu w próbkach surowicy chorych oznaczano pośrednio oceniając stężenie azotynów ( $\text{NO}_2^-$ ) i azotanów ( $\text{NO}_3^-$ ). Metoda ta opiera się na utlenianiu przez reduktazę azotanu NADPH podczas redukcji enzymatycznej jonów azotanowych do azotynowych. Pomiary wykonywano za pomocą zestawu zawierającego test kolorymetryczny — Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical Company, USA), który opiera się na reakcji z odczynnikiem Griessa. Detekcję absorbancji wobec próby ślepej przeprowadzono przy długości fali 540 nm na spektrofotometrze VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, LLC, USA). Stężenia azotynów/azotanów w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej.

### **5. ANALIZA STATYSTYCZNA**

Wyniki badań są przedstawione jako wartości średnie  $\pm$  SD. Analizę statystyczną wykonywano przy zastosowaniu testu Wilcozona dla zmiennych połączonych. Wartość  $p < 0,05$  przyjmowano jako statystycznie istotną.

## 6. WYNIKI

### 6.1. Badana populacja

Do badań zakwalifikowano 42 osoby, 13 kobiet i 29 mężczyzn, z przewlekłą niewydolnością nerek leczone hemodializami. Przyczyną niewydolności nerek u 10 chorych była nefropatia cukrzycowa, u 7 osób przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek, u 4 osób nefropatia niedokrwienna, u 4 osób cewkowo-śródmiąższowe uszkodzenie nerek, u 3 osób nefropatia obturacyjna. W pozostałych 14 przypadkach występowała nieznana przyczyna niewydolności nerek. Średni wiek chorych wynosił  $63 \pm 16$  lat (kobiety  $62 \pm 22$  lata, mężczyźni  $63 \pm 14$  lat). Średni czas dializoterapii wynosił  $27,1 \pm 21,0$  miesięcy.

Średnie wartości wybranych parametrów badanych chorych zostały przedstawione w tabeli 1.

**Tabela 1.** Średnie wartości wybranych parametrów u badanych chorych.

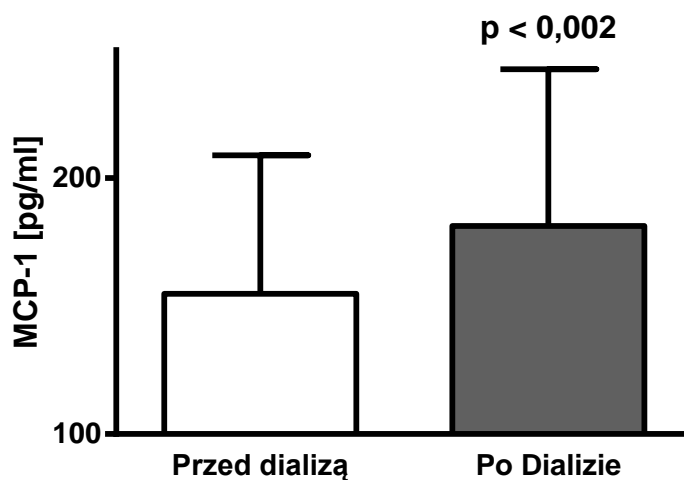
	<b>Parametr [jednostka]</b>	<b>Wartość średnia <math>\pm</math> SD</b>
1	Kreatynina [mg/dl]	$7,4 \pm 3,2$
2	Mocznik [mg/dl]	$116,2 \pm 21,7$
3	Filtracja kłębuszkowa wg. MDRD [ml/min]	$8,5 \pm 4,4$
4	Hemoglobina [g/dl]	$10,8 \pm 0,8$
5	Wapń całkowity [mmol/l]	$2,2 \pm 0,2$
6	Parathormon [pg/ml]	$619,3 \pm 490,5$
7	Białko całkowite [g/dl]	$6,6 \pm 0,5$
8	Albumina [g/dl]	$3,8 \pm 0,3$
9	Cholesterol [mg/dl]	$156,9 \pm 37,8$
10	Cholesterol-LDL [mg/dl]	$85,9 \pm 29,8$
11	Cholesterol-HDL [mg/dl]	$42,2 \pm 12,3$
12	Triglicerydy [mg/dl]	$156,9 \pm 37,8$

13	CRP [mg/l]	9,7 ± 9,9
14	Wskaźnik dializy Kt/V	1,2 ± 0,3

## 6.2. Wpływ zabiegu hemodializy na stężenie ocenianych parametrów

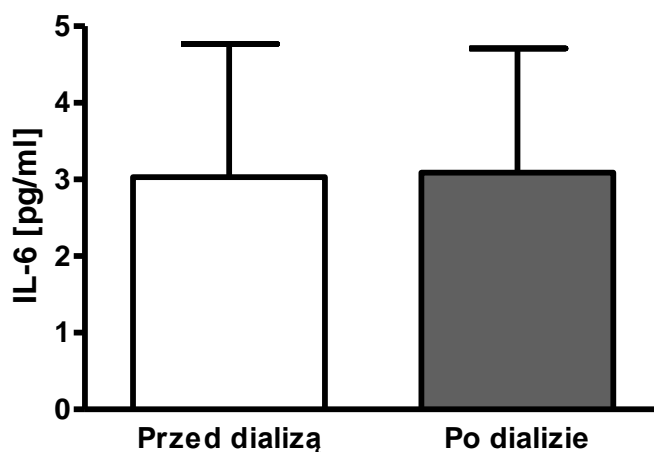
Zabieg hemodializy powodował zmiany w składzie surowicy chorych. Nie miały one jednak jednorodnego charakteru. Obserwowano wzrost niektórych wykładników odczynu zapalnego, natomiast stężenia innych nie ulegały zmianie.

Średnie stężenie MCP-1 w surowicy badanych chorych mierzone przed zabiegiem hemodializy było równe  $154,8 \pm 54,2$  pg/ml, a pod koniec zabiegu jego wartość była wyższa średnio o 17% ( $p < 0,002$ ) i wynosiła  $181,3 \pm 61,4$  pg/ml (Rycina 1).



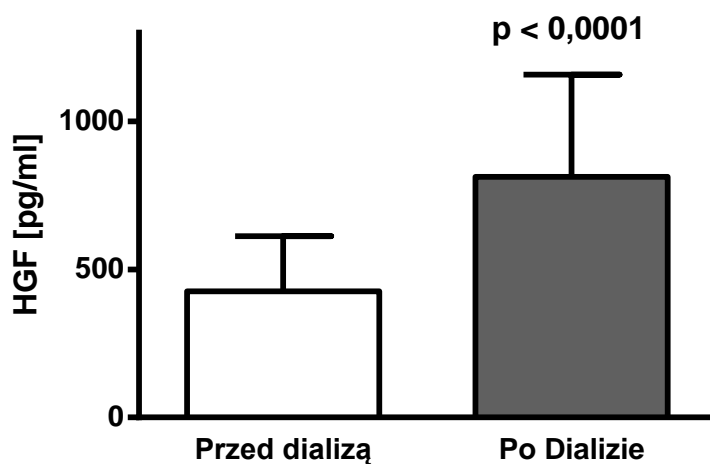
**Rycina 1.** Średnia wartość stężenia MCP-1 w surowicy chorych przed rozpoczęciem dializy oraz po zakończeniu zabiegu.

Stężenie Interleukiny-6 nie ulegało istotnym zmianom podczas zabiegu hemodializy. Przed zabiegiem jego średnia wartość była równa  $3,0 \pm 1,7$  pg/ml i ta wartość nie ulegała istotnym zmianom podczas zabiegu, po dializie wynosiła  $3,1 \pm 1,6$  pg/ml (Rycina 2).



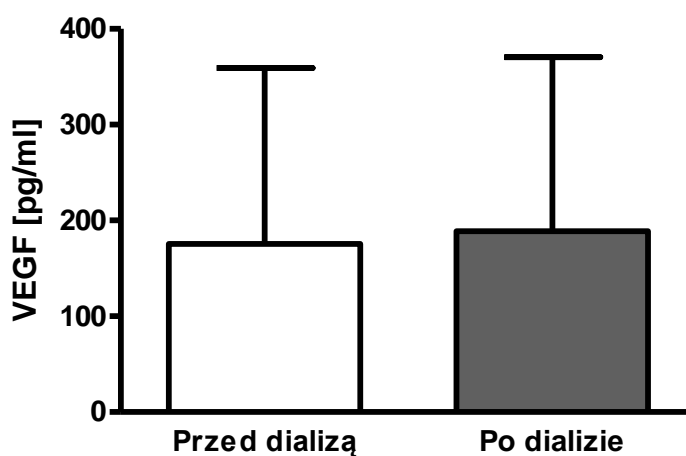
**Rycina 2.** Średnia wartość stężenia Interleukiny 6 (IL-6) w surowicy chorych przed rozpoczęciem dializy oraz po zakończeniu zabiegu.

Stężenie Czynnika Wzrostu Hepatocytów (HGF) ulegało znacznemu wzrostowi podczas zabiegu hemodializy. Średnia wartość stężenia tej cytokiny w surowicy chorych przed rozpoczęciem zabiegu hemodializy była równa  $426,4 \pm 186,2$  pg/ml i wzrastała pod koniec zabiegu o 91% ( $p < 0,0001$ ) do wartości  $813,4 \pm 345,6$  pg/ml (Rycina 3).



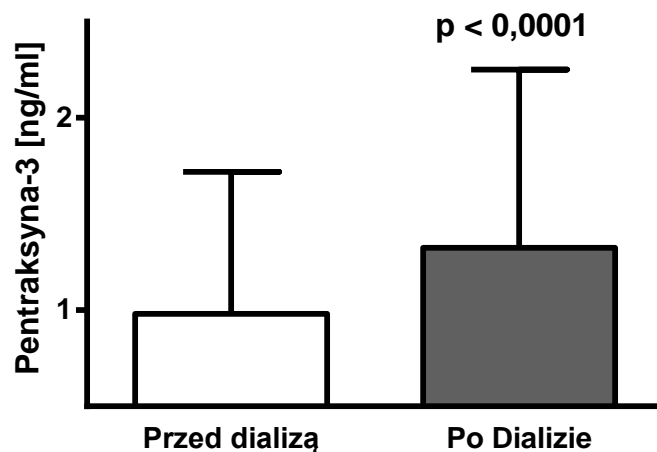
**Rycina 3.** Średnia wartość stężenia Czynnika Wzrostu Hepatocytów (HGF) w surowicy chorych przed rozpoczęciem dializy oraz po zakończeniu zabiegu.

Zabieg hemodializy nie powodował zmiany stężenia Czynnika Wzrostu Śródbłonna Naczyń (VEGF) w surowicy, średnia wartość stężenia tej cytokiny wynosiła  $175,6 \pm 183,5$  pg/ml przed zabiegiem oraz  $188,8 \pm 181,8$  pg/ml i nie ulegała zmianie w czasie (Rycina 4). Należy jednak zwrócić uwagę na znaczny rozrzut wartości stężenia tej cytokiny w surowicy badanych chorych (10,6 pg/ml – 949,3 pg/ml).



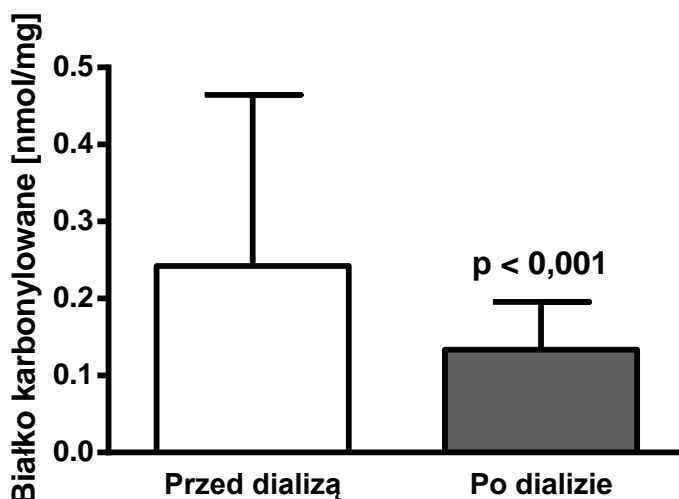
**Rycina 4.** Średnia wartość stężenia Czynnika Wzrostu Śródbłonna Naczyń (VEGF) w surowicy chorych przed rozpoczęciem dializy oraz po zakończeniu zabiegu.

Średnie stężenie Pentraksyny-3 w surowicy było równe  $1,0 \pm 0,7$  ng/ml i uległo zwiększeniu podczas zabiegu hemodializy o 30% ( $p < 0,0001$ ), do wartości  $1,3 \pm 0,9$  ng/ml (Rycina 5).



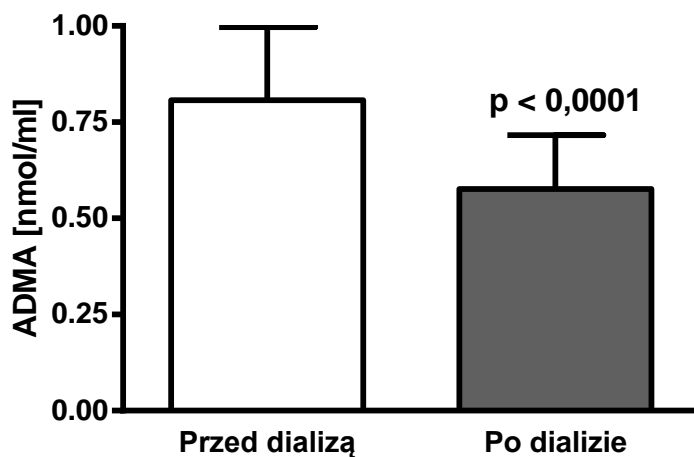
**Rycina 5.** Średnia wartość stężenia Pentraksyny-3 w surowicy chorych przed rozpoczęciem dializy oraz po zakończeniu zabiegu.

Stężenie karbonylowanego białka w surowicy ulegało zmniejszeniu podczas zabiegu hemodializy o 46% ( $p < 0,001$ ) ze średniej wartości wyjściowej  $0,24 \pm 0,22$  nmol/mg do  $0,13 \pm 0,06$  nmol/mg (Rycina 6).



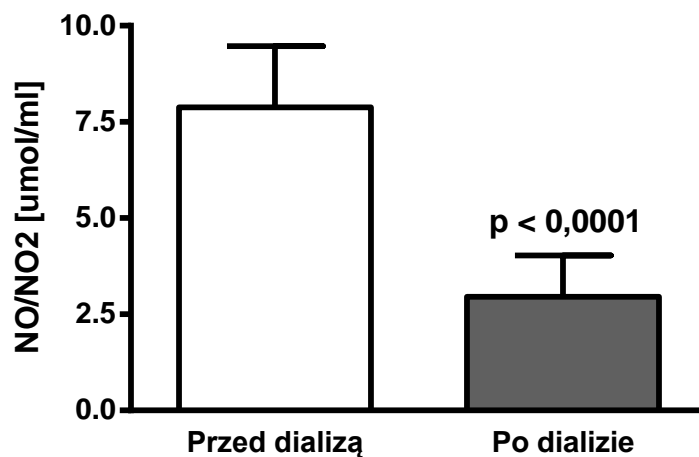
**Rycina 6.** Średnia wartość stężenia karbonylowanego białka w surowicy chorych przed rozpoczęciem dializy oraz po zakończeniu zabiegu.

Zabieg hemodializy powodował zmniejszenie o 25% ( $p < 0,0001$ ) stężenia asymetrycznej dimetyloargininy w surowicy chorych z poziomu  $0,81 \pm 0,19$  nmol/ml do  $0,58 \pm 0,14$  nmol/ml (Rycina 7).



**Rycina 7.** Średnia wartość stężenia asymetrycznej dimetyloargininy w surowicy chorych przed rozpoczęciem dializy oraz po zakończeniu zabiegu.

Podobnym zmianom ulegało również stężenie azotynów/azotanów w surowicy chorych poddawanych hemodializie. Średnia wartość wyjściowa azotynów/azotanów równa  $7,9 \pm 1,6$   $\mu\text{mol/ml}$  ulegała zmniejszeniu o 62% ( $p < 0,0001$ ) do wartości średniej  $2,9 \pm 1,1$   $\mu\text{mol/ml}$  (Rycina 8).

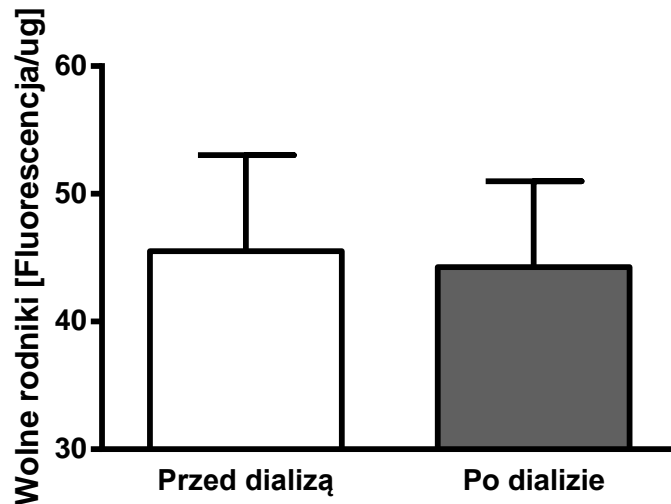


**Rycina 8.** Średnia wartość stężenia azotynów/azotanów w surowicy chorych przed rozpoczęciem dializy oraz po zakończeniu zabiegu.

### 6.3. Wpływ surowicy chorych uzyskanej *ex-vivo* na czynność komórek śródbłonna w hodowli *in vitro*

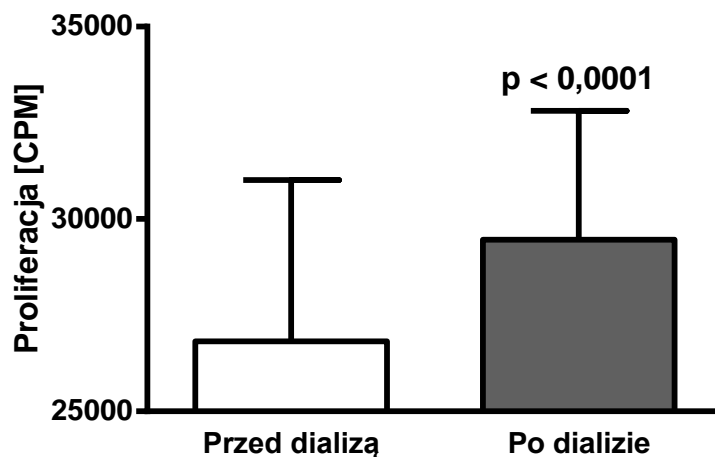
Generacja wolnych rodników w komórkach śródbłonna w hodowli *in vitro* eksponowanych na surowice uzyskane od chorych przed rozpoczęciem dializy i po zakończeniu zabiegu nie była istotnie różna (Rycina 9), przed dializą wynosiła  $45,5 \pm 7,5$  Fluorescencji/ $\mu\text{g}$ , natomiast po zabiegu  $44,3 \pm 6,7$  Fluorescencji/ $\mu\text{g}$ .





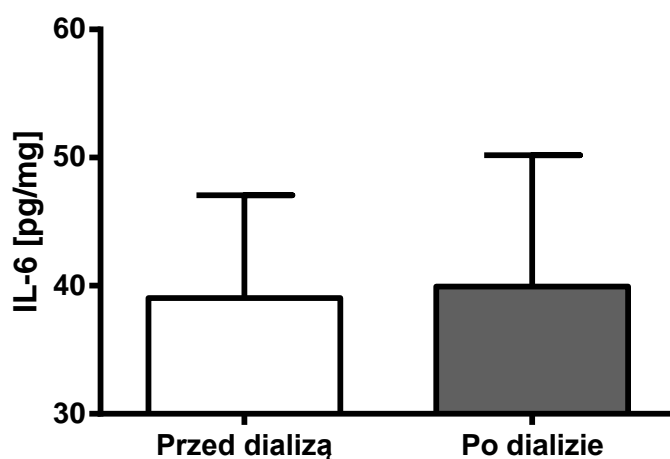
**Rycina 9.** Średnia wartość wewnątrzkomórkowej generacji wolnych rodników w komórkach śródbłónka w hodowli *in vitro* eksponowanych na surowice uzyskane od chorych przez rozpoczęciem dializy oraz po zakończeniu zabiegu.

Komórki śródbłónka w hodowli *in vitro* eksponowane na surowice uzyskane od chorych po zakończonym zabiegu hemodializy proliferowały szybciej (+ 10%,  $p < 0,0001$ ,  $29463 \pm 3352$  CPM) niż w przypadku ekspozycji na surowice uzyskane od chorych przed zabiegiem ( $26825 \pm 4188$  CPM) (Rycina 10).



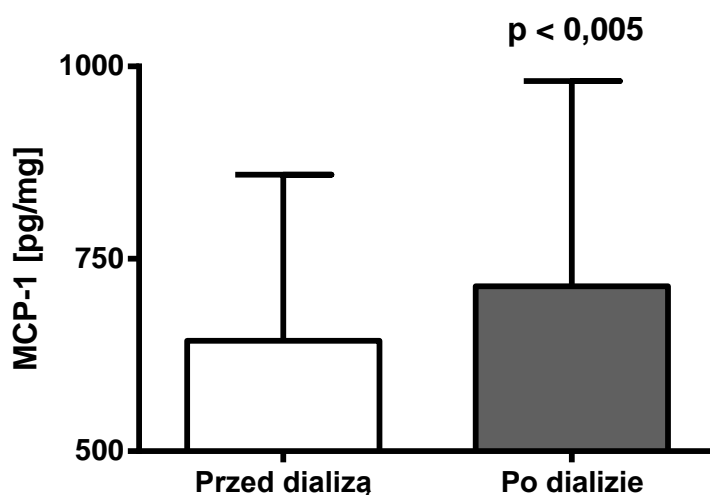
**Rycina 10.** Średnia wartość proliferacji komórek śródbłónka w hodowli *in vitro* eksponowanych na surowice uzyskane od chorych przed rozpoczęciem dializy oraz po zakończeniu zabiegu.

Ekspozycja komórek śródbłonna na surowice uzyskane od chorych po zakończeniu zabiegu hemodializy nie powodowała istotnego wzrostu syntezy interleukiny-6 (średnia wartość  $39,9 \pm 10,0$  pg/mg białka komórkowego), w porównaniu z wartościami uzyskanymi w obecności surowic pobranych przed zabiegiem (średnia wartość  $39,0 \pm 8,0$  pg/mg białka komórkowego) (Rycina 11).



**Rycina 11.** Średnia wartość syntezy interleukiny-6 (IL-6) produkowanej w komórkach śródbłonna w hodowli *in vitro* eksponowanych na surowice uzyskane od chorych przed rozpoczęciem dializy oraz po zakończeniu zabiegu.

Natomiast synteza chemokiny MCP-1 była większa (+ 11%;  $p < 0,005$ ) w komórkach śródbłonna eksponowanych na surowice uzyskane po zakończeniu zabiegu hemodializy (średnia wartość  $714,5 \pm 266,5$  pg/mg białka komórkowego), w porównaniu z wartościami obserwowanymi podczas ekspozycji na surowice pobrane od tych samych chorych przed rozpoczęciem zabiegu (średnia wartość  $643,4 \pm 216,0$  pg/mg białka komórkowego) (Rycina 12).



**Rycina 12.** Średnia wartość syntezy chemokiny MCP-1 produkowanej w komórkach śródbłonna w hodowli *in vitro* eksponowanych na surowice uzyskane od chorych przed rozpoczęciem dializy oraz po zakończeniu zabiegu.

## 7. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Choroby układu krążenia nadal pozostają główną przyczyną śmiertelności wśród chorych hemodializowanych [1, 2, 29, 63-65]. Coraz więcej danych zebranych na podstawie badań naukowych wskazuje, iż zwiększony stres oksydacyjny oraz stan zapalny są ściśle związane z patogenezą chorób układu sercowo-naczyniowego w tej populacji chorych [29, 63, 64, 66, 67]. Czynniki te wywierają ogromny wpływ na funkcję komórek śródbłonka naczyniowego. Z kolei dysfunkcja śródbłonka, będąca częstym zjawiskiem u chorych hemodializowanych, przynajmniej częściowo może tłumaczyć związek pomiędzy schyłkową niewydolnością nerek i hemodializoterapią a występowaniem chorób układu sercowo-naczyniowego w tej grupie chorych [29, 68].

Dysfunkcja śródbłonka naczyniowego odgrywa istotną rolę w powstawaniu miażdżycy oraz rozwoju chorób układu krążenia [3, 69]. Nieprawidłowa czynność śródbłonka wiąże się ze zmniejszeniem biodostępności tlenu azotu, który odgrywa zasadniczą rolę w utrzymaniu odpowiedniego napięcia naczyniowego oraz uczestniczy w reakcjach naczynioruchowych tętnic wieńcowych [69, 70]. Dochodzi również do zwiększonego przylegania płytek oraz leukocytów do ściany naczyniowej, pobudzenia płytek i monocytów, nasilenia mechanizmów oksydacyjnych i prozakrzepowych, aktywacji ulegają także procesy trombogenezy, zapalenia i wzmożonego kurczu naczyń [9, 14, 22.].

Wobec powyższych rozważań badania przeprowadzone w niniejszej pracy miały na celu ocenę odczynu zapalnego i stresu oksydacyjnego w surowicy chorych hemodializowanych oraz wpływu tej surowicy na funkcję komórek śródbłonka naczyniowego w hodowli *in vitro*. W niniejszej pracy badano szereg biochemicznych markerów funkcji śródbłonka u chorych hemodializowanych.

Hemodializa może przyczynić się do wystąpienia i nasilenia stanu zapalnego u chorych poddawanych temu zabiegowi [71, 72], co związane jest z takimi czynnikami jak: zakażenia dostępu naczyniowego, nieczystości w wykorzystywanym dializacie oraz reakcje z błoną dializacyjną [71]. Chorzy hemodializowani narażeni są również na zjawiska potęgujące stres oksydacyjny, do których należałoby wymienić: stres hemodynamiczny spowodowany zmianami wypełnienia łożyska naczyniowego pomiędzy zabiegami oraz podczas samego zabiegu, wahania ciśnienia krwi, szybkie zmiany stężenia elektrolitów w surowicy, bioniezgodność błon dializacyjnych, a także zanieczyszczenia w płynie dializacyjnym [73]. W ciągu ostatnich lat odnotowano występowanie kilkunastu biochemicznych markerów stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego, stężenia niektórych z tych parametrów były badane w mojej pracy.

Jednym z parametrów stanu zapalnego, który analizowano w niniejszej pracy badawczej, było Białko Chemotaktyczne dla Monocytów. MCP-1 jest chemokiną produkowaną przez różnorodne komórki włączając: monocyty, fibroblasty, komórki śródbłonna i mięśni gładkich w odpowiedzi na cytokiny zapalne, takie jak IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Interferon (ang. *Interferon*, INF), Płytkopochodny Czynniki Wzrostu oraz utlenowane lipoproteiny [24, 74]. Pełni ona ważną rolę w migracji limfocytów T oraz monocytów i makrofagów w kierunku miejsc o zwiększonej aktywności stanu zapalnego, reguluje proliferację komórek mięśni gładkich ściany naczyniowej [24, 74, 75], jej działanie przyczynia się do powstania blaszki miażdżycowej [24].

Papayianni i wsp. wykazali podwyższone stężenia MCP-1 w surowicy pobranej od chorych hemodializowanych przed zabiegiem w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną [24]. Badacze stwierdzili istotne zwiększenie stężenia MCP-1 po hemodializie niezależnie od rodzaju zastosowanej podczas zabiegu błony dializacyjnej [24].

Analogiczne spostrzeżenia do Papayianni i wsp. odnotowałam w przeprowadzonych przeze mnie badaniach. Zaobserwowałam istotny wzrost stężenia MCP-1 po zabiegu hemodializy (średnio o 17%) w porównaniu ze stężeniem tej chemokiny sprzed zabiegu.

Cytokiną prozapalną o najbardziej wielokierunkowym działaniu, będącą jednym z głównych czynników regulujących mechanizmy obronne organizmu, jest IL-6. Uczestniczy ona w reakcjach zapalnych organizmu, odpowiedzi immunologicznej oraz procesie krwiotworzenia [77]. Interleukina-6 jest produkowana głównie przez makrofagi, monocyty, fibroblasty, limfocyty B i T, komórki śródbłonna, nabłonka jelitowego, hepatocyty, keratynocyty, chondrocyty i komórki owodni [78-80]. Jej synteza jest stymulowana przez IL-1, INF, TNF, lipopolisacharydy, utlenione lipidy, wirusy DNA i RNA [79, 80].

IL-6 działa jako czynnik stymulujący końcowe różnicowanie aktywowanych limfocytów B w kierunku komórek produkujących immunoglobuliny różnych klas. IL-6 aktywuje również limfocyty NK oraz wpływa na limfocyty T, stymulując ich proliferację i różnicowanie w kierunku limfocytów T cytotoksycznych [78, 80]. IL-6 jest głównym regulatorem wytwarzania przez komórki wątroby białek stanu zapalnego, w tym CRP, fibrynogenu, Inhibitora Aktywatora Plazminogenu-typu 1 oraz osoczowego białka amyloidowego [72, 79]. Zwiększone wytwarzanie białek fazy ostrej stanu zapalnego przyczynia się do uogólnionego procesu zapalnego, nasilenia miejscowej reakcji zapalnej i zmniejszenia właściwości fibrynolitycznych, co w konsekwencji prowadzi do destabilizacji blaszki miażdżycowej [79]. Wpływając na układ krwiotworzenia IL-6 pobudza proliferację i różnicowanie multipotencjalnych komórek macierzystych i progenitorowych wielu szeregów, a zwłaszcza megakariocytarnego, erytroidalnego i granulocytarno-makrofagowego [78, 80]. Interleukina-6 nasila produkcję płytek krwi, sprzyja ich agregacji oraz zwiększa wrażliwość płytek na trombinę [79, 80]. Cytokina ta stymuluje także aktywność osteoklastów i wpływa na układ kostny [78].

Wykazano istotnie wyższe stężenia IL-6 u chorych z przewlekłą chorobą nerek (wyłączając chorych hemodializowanych) w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną [22], niezależnie od oszacowanej wg MDRD wielkości przesączania kłębuszkowego [81]. Podwyższone wartości IL-6 odnotowano zwłaszcza u chorych z rozpoznaną chorobą naczyniową, cukrzycą oraz z hipercholesterolemią [81].

W kilku przeprowadzonych badaniach zaobserwowano znacznie wyższe stężenia IL-6 u chorych hemodializowanych niż u zdrowych badanych [22, 63, 65]. Jednakże nie stwierdzono istotnych zmian w stężeniach IL-6 po rozpoczęciu leczenia nerkozastępczego metodą hemodializoterapii, co może sugerować, iż hemodializa nie jest skutecznym zabiegiem kontrolującym stan zapalny oraz stres oksydacyjny w mocznicy [63].

Kato i wsp. wykazali istotny wpływ stężenia IL-6 na stopień zaawansowania miażdżycy tętnic szyjnych u chorych hemodializowanych mierzony za pomocą oceny grubości kompleksu *intima-media* (ang. *intima-media thickness*, IMT) oraz pola powierzchni poprzecznej kompleksu *intima-media* (ang. *intima-media cross-sectional area*, IM area) w tętnicach szyjnych [82].

Istnieją rozbieżności w ocenie wpływu pojedynczego zabiegu hemodializy na stężenie IL-6. Yamamoto i wsp. wykazali istotnie wyższe stężenia IL-6 u chorych z przewlekłą chorobą nerek po hemodializie w porównaniu z wartościami sprzed zabiegu [71]. W innych badaniach natomiast nie wykazano istotnej różnicy między początkowym stężeniem IL-6 oraz w trakcie hemodializy [72, 83], pomimo że stwierdzono tendencję do jego wzrostu [72]. Należałoby zwrócić uwagę na fakt, iż obserwowano istotne zwiększenie stężenia IL-6 2 godziny po zakończeniu hemodializy [72]. Zjawisko to prawdopodobnie wytłumaczyć można reakcją zapalną w odpowiedzi na hemodializę [72]. Badania przeprowadzone na grupie hemodializowanych dzieci wykazały, iż leczenie hemodializami nie ma wpływu na stężenie interleukiny-6 oraz interleukiny-10 [35]. Wartości IL-6 były odwrotnie proporcjonalne do

parametrów wydajności hemodializy (Kt/V), co mogłoby sugerować, że wysokie dawki hemodializy mogą obniżać wyjściowe stężenie IL-6 [35].

Wykonane przeze mnie badania wykazują, iż zabieg hemodializy nie miał istotnego wpływu na zmianę stężenia IL-6 w surowicy badanych chorych, co potwierdza wyniki przedstawione przez Goldstein, Tarakçioğlu oraz Caglar i wsp. [38, 72, 83]. Należy jednakże podkreślić, że w obecnych badaniach surowicę pobierano od chorych bezpośrednio po zakończeniu zabiegu, a jak zauważył Goldstein i wsp., znaczny wzrost stężenia IL-6 występował dwie godziny po zakończeniu zabiegu. Wnioski wysunięte przez Goldsteina potwierdzają hipotezę, iż stężenie IL-6 rośnie znacznie wolniej w porównaniu z opisywanym poniżej markerem stanu zapalnego jakim jest Pentraksyna-3, szczyt stężenia IL-6 obserwuje się 2-6 godzin od zadziałania czynnika uszkodzającego tkankę [84]. Co istotne, w przeprowadzonym przeze mnie eksperymencie do hemodializy używano niereużytyzowanych dializatorów kapilarnych z błoną polisulfonową, w przeciwieństwie do Yamamoto i wsp., który stosował reużytyzowane błony celulozowe [71]. W dostępnej literaturze podaje się, iż błony syntetyczne w większym stopniu wykazują biozgodność w porównaniu z błonami celulozowymi, w mniejszym stopniu przyczyniają się do aktywacji układu dopełniacza, elastazy granulocytowej, słabiej wpływają na zmiany liczby leukocytów, neutrofilów, monocytów, limfocytów, płytek krwi oraz stężenie  $\beta_2$ -mikroglobuliny [85-87].

Kolejną cytokiną o plejotropowym działaniu analizowaną w niniejszej pracy jest HGF. HGF produkują różnorodne komórki pochodzenia mezenchymalnego, takie jak: komórki Kupffera, płucne fibroblasty i komórki mezangium [88, 89]. HGF uczestniczy w ochronie i procesach naprawczych śródbłonna oraz innych tkanek organizmu, pełni bardzo ważną rolę w regeneracji komórek wątrobowych, mięśnia sercowego i neurocytów, bierze udział w aktywacji erytropoezy, gojeniu ran, procesie programowanej śmierci komórek, tworzeniu nowych naczyń krwionośnych oraz reguluje miejscową i ogólnoustrojową reakcją zapalną



[89, 90]. Badania doświadczalne wykazały, że HGF pobudza syntezę DNA komórek cewkowych oraz przyspiesza gojenie tych komórek po urazach mechanicznych [88]. HGF wykazuje również działanie mitogenne w stosunku do komórek nabłonkowych oraz morfogenne w stosunku do komórek cewkowych nerek w hodowli *in vitro* [88, 89]. HGF u ludzi ma właściwości endo- oraz parakryne [88], a także pobudza osteoklasty, co przyczynia się do resorpcji kości i osteoporozy [90]. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że uszkodzenie tkanki, np. nerki lub wątroby, wiąże się ze znacznym wzrostem ekspresji HGF, nie tylko w naruszonej tkance, ale również w odległych narządach, jak np. płuca, śledziona [91].

Sugimura i wsp. wykazał, że chorzy z przewlekłą chorobą nerek charakteryzują się istotnie wyższymi wartościami HGF w surowicy w porównaniu ze zdrowymi badanymi, a stężenia HGF korelują ze stężeniami kreatyniny w surowicy [92]. Obserwacje te znajdują potwierdzenie w badaniach Lohra i wsp., którzy również odnotowali większe wartości HGF w grupie chorych hemodializowanych w stosunku do zdrowych badanych [93]. Odmienne spostrzeżenia przedstawiają Rampino i wsp., którzy nie stwierdzili istotnej różnicy w wartościach HGF u chorych hemodializowanych w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną, jednakże zaobserwowali wzrost stężenia HGF w trakcie hemodializy [89]. Badacze tłumaczą zjawisko to wpływem leukocytów na uwalnianie HGF, albowiem wzrost ich stężenia obserwuje się także podczas hemodializy [89].

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach odnotowałam znaczny wzrost stężenia HGF podczas zabiegu hemodializy, o 91%. Na podstawie tych spostrzeżeń można by wysunąć wniosek, że hemodializoterapia powoduje powtarzalny podczas każdego zabiegu istotny wzrost ekspresji HGF, cytokiny związanej z aktywacją stanu zapalnego.

Stwierdzono, iż stężenia HGF w osoczu chorych hemodializowanych są bezpośrednio związane i niezależnie korelują z czasem trwania hemodializy, wiekiem oraz stężeniem CRP,

co może sugerować, iż podwyższone wartości HGF świadczą o zwiększonym, przewlekłym stanie zapalnym u pacjentów hemodializowanych [94]. Wykazano również, że stężenia HGF dodatnio korelują z grubością kompleksu *intima-media*. Podwyższone wartości HGF rokują krótszy czas przeżycia w analizie modelem regresji Coxa [94], co mogłoby oznaczać, iż HGF jest markerem procesu wpływającego na zwiększoną śmiertelność w grupie chorych hemodializowanych.

Sugimura i wsp. odnotowali wyższe wartości HGF wraz z wydłużaniem się czasu leczenia nerkozastępczego. Chorzy hemodializowani przez 5-10 lat charakteryzowali się wyższymi stężeniami HGF w porównaniu do chorych hemodializowanych przez 1 rok lub mniej [92]. Libetta i wsp. wykazali natomiast ujemną zależność wyjściowych stężeń HGF przed hemodializą u chorych z ostrym uszkodzeniem nerek z czasem powrotu funkcji nerek, definiowanym jako przerwanie hemodializoterapii u chorego, u którego nastąpił powrót diurezy [88].

Celem oceny stanu zapalnego u chorych hemodializowanych w niniejszej pracy analizowałam stężenia VEGF w surowicy, cytokiny biorącej udział w różnorodnych procesach biologicznych, która pełni także istotną rolę jako czynnik wzrostowy śródbłonka oraz zwiększający przepuszczalność naczyń [95, 96]. VEGF jest silnym czynnikiem mitogennym dla komórek śródbłonka pochodzących z tętnic, żył i naczyń limfatycznych, poza tym wywiera wpływ na migrację, wzrost, różnicowanie i hamowanie apoptozy tych komórek [95]. VEGF jest również cząsteczką uczestniczącą w zjawisku angiogenezy, niezbędną dla procesu różnicowania komórek śródbłonka z angioblastów (waskulogenezy) oraz tworzenia nowych naczyń z już istniejących (angiogenezy) [95, 96]. Umożliwia osadzanie regeneracyjnych komórek śródbłonka w miejscu, gdzie występują lokalne zmiany naczyniowe [97].

VEGF pobudza również migrację komórek mięśni gładkich naczyń, chemotaksję monocytów i tworzenie kolonii przez komórki progenitorowe układu granulocyty-makrofagi, jako czynnik wzrostowy bierze udział w procesie nefrogenyzy [95]. W procesie starzenia nerek, obserwuje się utratę ekspresji VEGF w podocytach, co może wiązać się ze zmniejszoną liczbą komórek progenitorowych śródbłonna [98].

W dotychczas przeprowadzonych badaniach istnieją rozbieżności co do wartości VEGF w osoczu chorych z przewlekłą chorobą nerek. Wątopek, Jie oraz Harper i wsp. stwierdzili istotnie wyższe stężenia VEGF u chorych z przewlekłą chorobą nerek (w przypadku badania Wątopek i wsp. z wyłączeniem chorych hemodializowanych) w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną [68, 99, 100]. Wykazano, iż stężenie VEGF w osoczu chorych z mocznicą związane było ze stopniem zaawansowania choroby nerek [68, 99] oraz podwyższonymi wartościami markerów dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, takimi jak E-selektyna, trombomodulina, Cząsteczka Adhezji Międzykomórkowej-1 oraz Cząsteczka Adhezji Komórkowej Naczyń-1 [68]. Przeciwnie wyniki przedstawili Futrakul i wsp., którzy stwierdzili istotnie niższe stężenia VEGF u chorych z przewlekłą chorobą nerek [101].

Sprzeczne doniesienia odnotowano również w stosunku do wartości VEGF u chorych hemodializowanych. Wątopek i wsp. wykazali znacząco niższe stężenia VEGF u chorych hemodializowanych [99]. Natomiast inni badacze stwierdzili, że pacjenci poddawani hemodializie charakteryzowali się istotnie wyższymi stężeniami VEGF w porównaniu ze zdrowymi badanymi [102-105]. Inni autorzy nie wykazali znaczącej różnicy w stężeniach VEGF w osoczu chorych hemodializowanych w porównaniu z grupą kontrolną [47, 106, 107]. Wyższe wartości VEGF wiązały się z niedotlenieniem oraz kwasicyą [102]. W niektórych badaniach wykazano związek pomiędzy nasilonym stresem oksydacyjnym a stężeniami VEGF u chorych hemodializowanych [104, 105, 108].

W literaturze brak jest jednak doniesień na temat wpływu zabiegu hemodializy na stężenia VEGF. W moich badaniach nie odnotowałam istotnej różnicy w stężeniach VEGF w surowicy chorych z przewlekłą chorobą nerek przed i po zabiegu hemodializy. Stwierdziłam jednakże znaczny rozrzut wartości tej cytokiny w surowicy badanych chorych. W kontekście przedstawionych przeze mnie spostrzeżeń pojawia się pytanie, czy zabieg hemodializy wiąże się ze zwiększoną aktywacją stanu zapalnego, skoro nie wykazano istotnej różnicy w stężeniach VEGF przed i po zabiegu. W literaturze opisuje się, iż chorzy z przewlekłą chorobą nerek charakteryzują się osłabionym procesem tworzenia nowych naczyń krwionośnych, co mogłoby tłumaczyć brak wzrostu wartości VEGF po hemodializie [99, 109, 110].

Pentraksyny są grupą białek uważanych za markery fazy ostrej stanu zapalnego [111-113]. Zostały one podzielone na dwie podgrupy: pentraksyna krótka, do której zalicza się CRP i jest produkowana przez wątrobę oraz długa, do której należy omawiana poniżej Pentraksyna-3, z ekspresją odnotowaną w szeregu komórek takich jak: komórki śródbłonna, dendrytyczne, nabłonka i mięśni gładkich oraz fagocyty jednojądrzaste, fibroblasty i adipocyty [112, 113]. Produkcja Pentraksyny-3 może być stymulowana przez cytokiny (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF) oraz lipopolisacharyd. Odnotowano znaczący wzrost jej stężenia w przypadku sepsy, miażdżycy, zapaleń naczyń, zapalenia stawów, łuszczycy, po zawale mięśnia sercowego oraz po zabiegu operacyjnym [111, 112]. PTX-3 wiąże się z komplemtem C1q, a indukując aktywację tegoż komplementu, zwiększa zdolności do fagocytozy oraz zabijania zopsonizowanych komórek i bakterii, może także wpływać na zdolności autoimmunologiczne organizmu [111].

Istnieją rozbieżności co do oceny stężeń PTX-3 w mocznicy. Tong i wsp. stwierdzili istotnie wyższe wartości PTX-3 u chorych z przewlekłą chorobą nerek w porównaniu z grupą kontrolną, najwyższe stężenia zaobserwowali u pacjentów w stopniu 5 choroby nerek.

U wszystkich pacjentów z chorobą nerek wykazano odwrotną zależność między wielkością filtracji kłębuszkowej a stężeniem Pentraksyny-3 oraz pozytywną zależność z markerami stanu zapalnego [84]. Podwyższone wartości PTX-3 związane były ze zwiększoną śmiertelnością chorych z mocznicą [84]. Inni badacze natomiast nie wykazali istotnej różnicy w stężeniach PTX-3 u pacjentów z chorobą nerek niehemodializowanych w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną [102, 111].

W przeciwieństwie do przytoczonych danych, jednakowe wnioski odnotowano na temat stężeń PTX-3 wśród chorych hemodializowanych. Stwierdzono istotnie wyższe wartości PTX-3 u chorych poddawanych hemodializie w porównaniu z pacjentami z chorobą nerek niewymagającymi tego zabiegu oraz ze zdrową grupą kontrolną [65, 102, 111, 112]. Obserwowano podwyższone stężenia PTX-3 u chorych hemodializowanych z chorobą sercowo-naczyniową [71, 102, 111], a co istotne, wyższe wartości PTX-3 były niezależnie związane ze zwiększoną śmiertelnością ogólną, stężeniami markerów stanu zapalnego, wskaźnikiem współchorobowości [71, 112] oraz znacznie dłuższym czasem stosowania terapii nerkozastępczej [111]. Wykazano znacznie wyższe wartości PTX-3 u chorych z przewlekłą chorobą nerek po zabiegu hemodializy w porównaniu z wartościami sprzed zabiegu [71].

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów prowadzą do podobnych spostrzeżeń. Odnotowałam istotne (o 30%) zwiększenie stężenia PTX-3 w surowicy pobranej od chorych po hemodializie w porównaniu ze stężeniem w surowicy sprzed zabiegu. W odniesieniu do przedstawionych rozważań można wysnuć wniosek, iż zabieg hemodializy powoduje zwiększoną ekspresję PTX-3. Uważa się, że PTX-3 jest szybko produkowana w miejscu stanu zapalnego przez komórki układu immunologicznego i komórki śródbłonka w odpowiedzi na sygnał indukujący zapalenie [84]. Aby potwierdzić fakt, że PTX-3 może reprezentować pierwotną, lokalną aktywację systemu immunologicznego i procesu zapalnego,

należałoby przytoczyć pracę Peri i wsp., którzy stwierdzili podwyższone stężenia PTX-3 w surowicy chorych ze świeżym zawałem mięśnia sercowego, a następnie wykazali powrót do wartości normalnych PTX-3 przy wypisie ze szpitala [114]. Badacze zasugerowali, iż PTX-3 jest wczesnym wskaźnikiem uszkodzenia miocytów w zawałe mięśnia sercowego [114]. Obserwacje te tłumaczą znaczny wzrost stężenia tej substancji po pojedynczym zabiegu hemodializy.

Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują, iż pojedyncza sesja hemodializy powoduje zwiększenie niektórych markerów stanu zapalnego, takich jak MCP-1, HGF, Pentraksyna-3, natomiast nie ma wpływu na stężenia IL-6 oraz VEGF wśród hemodializowanych chorych.

Celem oceny stopnia nasilenia stresu oksydacyjnego wśród chorych z przewlekłą chorobą nerek stosuje się oznaczanie białka karbonylowanego, które jest jednym z parametrów długotrwałego uszkodzenia śródbłonka przez stres oksydacyjny. Hemodializa oraz zwiększenie stężenia reaktywnych form tlenu może prowadzić do reakcji z białkami i ich modyfikacji, co powoduje wzrost stężenia białka karbonylowanego [115, 116].

Wykazano istotnie wyższe stężenia białka karbonylowanego u pacjentów w 3-5 okresie przewlekłej choroby nerek (z wyjątkiem chorych hemodializowanych) w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną [81, 117], niezależnie od oszacowanej wg MDRD wartości GFR [81]. W wielu pracach zaobserwowano także istotnie wyższe wartości białka karbonylowanego u chorych hemodializowanych w porównaniu z grupą kontrolną [63, 64, 117, 118].

Albarello i wsp. oraz Varan i wsp. wykazali wyższe stężenia białka karbonylowanego u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek po zabiegu hemodializy w porównaniu z wartościami sprzed zabiegu [64, 115]. Przeciwną obserwację przedstawił Mayer i wsp., stwierdzając, iż sam zabieg hemodializy nie powodował istotnych zmian w stężeniu tego białka [118]. Pojawiły się również sugestie, że hemodializoterapia nie wpływa na stan zapalny i stres

oksydacyjny w moczniccy, gdyż nie stwierdzono istotnych zmian w stężeniach białka karbonylowanego u chorych po rozpoczęciu hemodializoterapii w porównaniu z okresem sprzed zabiegu [63]. Niektórzy badacze porównując chorych hemodializowanych z i bez cukrzycy stwierdzili istotnie wyższe wartości białka karbonylowego w porównaniu z grupą kontrolną w obu grupach [116]. Wykazali także wzrost jego stężenia po zabiegu hemodializy [116]. W moich badaniach odnotowałam istotne zmniejszenie stężenia białka karbonylowanego po zabiegu hemodializy, podobnie jak Albarello i Varan [115]. Obserwacja ta nie potwierdza prooksydacyjnego działania zabiegu hemodializy. Różnice pomiędzy wynikami w poszczególnych badaniach mogą wynikać z odmienności protokołów dializy, stosowanych aparatów i błon dializacyjnych.

Kolejnym ważnym markerem nasilonego stresu oksydacyjnego oraz dysfunkcji śródbłonna naczyniowego jest asymetryczna dimetyloarginina. ADMA jest endogennym inhibitorem e-NOS, prowadzi do zmniejszenia syntezy tlenku azotu, wskutek czego może modyfikować istotnie funkcję śródbłonna naczyniowego [16]. Wytwarzana jest podczas hydrolizy białek bogatych w metylowane reszty argininowe [16]. Boeger i wsp. potwierdzili, iż podwyższone stężenia ADMA wiążą się z upośledzoną funkcją wazodylatacyjną śródbłonna u osób z hipercholesterolemią oraz nadciśnieniem tętniczym [110].

W grupie chorych hemodializowanych wartości ADMA są silnym, niezależnym czynnikiem rokowniczym śmiertelności ogólnej oraz wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych [119]. Stwierdzono dodatnią zależność między stężeniami ADMA a grubością kompleksu *intima-media* mierzoną w tętnicach szyjnych u chorych hemodializowanych [120, 121]. Pacjenci z przewlekłą chorobą nerek charakteryzują się istotnie wyższymi wartościami ADMA w porównaniu ze zdrowymi badanymi [122], w grupie tej stwierdzono odwrotną zależność pomiędzy GFR a wartościami ADMA [122, 123]. Podwyższone stężenia ADMA są niezależnym czynnikiem ryzyka postępu przewlekłej choroby nerek [122], związane są ze

zwiększoną częstością wystąpienia [124] i zaawansowania choroby wieńcowej [123], podwyższoną śmiertelnością ogólną oraz z przyczyn sercowo-naczyniowych [122, 124].

Obecnie występują sprzeczne opinie na temat wartości ADMA u chorych hemodializowanych. Raj i wsp. stwierdzili podwyższone stężenia ADMA przed i po dializie, co może doprowadzić do zahamowania produkcji NO, jednakże wykazali także wzrost stosunku L-argininy/ADMA po zabiegu hemodializy, co może przyczynić się do zwiększenia syntezy NO [26]. W innym badaniu, Kielstein i wsp. zauważyli, że stężenia ADMA przed zabiegiem hemodializy u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek były sześciokrotnie wyższe w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną w połączeniu z istotnie niższymi wartościami azotynów [125]. Wartości ADMA 1 godzinę po zakończeniu hemodializy były istotnie wyższe w porównaniu z wartościami sprzed zabiegu, a kolejny pomiar 5 godzin po zakończeniu hemodializy uwidocznił istotny spadek stężenia ADMA [125]. Obserwowano również wyższe wartości ADMA u chorych hemodializowanych z miażdżycą w porównaniu z chorymi bez miażdżycy [125]. Natomiast Errakonda i wsp. zaobserwował obniżenie stężenia ADMA po hemodializie, co potwierdził Hewitson i wsp. [29] oraz zwiększenie wskaźnika L-arginina/ADMA, sugerujące zwiększoną produkcję NO podczas hemodializy [8].

W moich badaniach odnotowałam istotny spadek (o 25%) stężenia asymetrycznej dimetyloargininy po zabiegu hemodializy. Obserwowany spadek, a nie, jak należałoby się spodziewać, wzrost wartości ADMA sugerujący dysfunkcję śródbłonna, może być związany z ze zmianami stężeń substancji wazoaktywnych o przeciwnym działaniu oraz powstanie w ten sposób "efektu zero" [29]. Na wartości ADMA przed i po zabiegu hemodializy mogą wpływać również zmiany objętości płynów wewnątrzustrojowych oraz współczynnik oczyszczania podczas hemodializy.

Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego jest związana z nieprawidłową aktywnością tlenu azotu. NO pełni nie tylko funkcję wazodylatacyjną, ale może również



współuczestniczyć w uszkodzeniu wielu tkanek. Indukowana stresem oksydacyjnym reakcja pomiędzy NO a nadtlakiem, uwalnianym na przykład z leukocytów, powoduje powstanie nadtlaknoazotynu, który może niszczyć szereg tkanek, w tym śródbłonek, i prowadzić do miażdżycy [64, 126]. NO jest wysoce niestabilny, jego okres półtrwania trwa zaledwie kilka sekund, dlatego też jego bezpośrednie pomiary są bardzo trudne do wykonania [25]. Aby określić ilość produkowanego w organizmie tlenu azotu używa się dwóch metod: pomiary stężenia azotynów/azotanów, produktów przemiany NO oraz pomiary NO w powietrzu wydychanym. W mojej pracy zastosowałam w tym celu ocenę stężenia azotynów/azotanów.

W literaturze wykazano istotnie wyższe wartości azotanów/azotynów u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (niehemodializowanych) [126] oraz hemodializowanych [25, 64, 126] w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną. Przeciwnie obserwowano do cytowanych powyżej przedstawił Kielstein i wsp., którzy odnotowali istotnie niższe stężenia azotynów/azotanów u chorych hemodializowanych w porównaniu ze zdrowymi badanymi [125]. Potwierdza to wcześniejsze badanie, w którym stwierdzono niższe w porównaniu z grupą kontrolną wartości azotynów/azotanów u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek [127].

Analizując wpływ hemodializy na stężenia azotynów/azotanów, wykazano obniżone ich wartości w surowicy po hemodializie [25, 26, 64, 126, 128]. Raj i wsp. oraz Sumino i wsp. twierdzą, iż nie są one jednakże odpowiednim markerem do oceny produkcji NO, gdyż są efektywnie usuwane podczas hemodializy [25, 26]. Errakonda i wsp. również stwierdzili obniżone stężenia azotynów/azotanów po zabiegu hemodializy, ale po skorygowaniu ze stężeniem kreatyniny, podwyższone wartości azotynów/azotanów potwierdzają zwiększoną produkcję NO [8]. Kielstein i wsp. natomiast bezpośrednio po zabiegu wykazali wzrost stężenia azotynów/azotanów, a następnie powrót do wartości wyjściowych tych substancji [125].

W moich badaniach odnotowałam obniżenie stężenia azotynów/azotanów po zabiegu hemodializy o 62%. W kontekście sprzecznych doniesień przedstawionych powyżej oraz wykazania przeze mnie zmniejszenia wartości ADMA, inhibitora syntazy NO, po zabiegu hemodializy, pojawia się pytanie, jak wytłumaczyć zmniejszenie stężenia azotynów/azotanów po hemodializie. Mechanizmy odpowiedzialne za nieprawidłową biodostępność tlenku azotu u chorych hemodializowanych nie są do końca poznane. Pomimo faktu, iż aktywacja cytokin związana z hemodializą może powodować wzrost produkcji NO, jednakże jego biodostępność może być obniżona poprzez zwiększoną degradację NO, zmniejszoną aktywność syntazy NO i biodostępność L-argininy [33] oraz usuwanie metabolitów NO w trakcie hemodializy [33, 126]. Jak twierdzi Clermont i wsp. oraz Varan i wsp., na początku hemodializy oraz pomiędzy zabiegami obserwuje się zwiększenie stężenia azotynów/azotanów na co wpływ ma zastosowanie heparyny, naprężenie ścinające, interakcje z błoną dializacyjną, a także aktywacja leukocytów i cytokin zapalnych, natomiast po hemodializie następuje obniżenie stężenia tych substancji w związku z ich eliminacją podczas zabiegu [64, 126].

Hemodializa charakteryzuje się nasiloną produkcją ROS [115], jednakże brak jest na razie dokładnych danych na temat wpływu zabiegu hemodializy na stężenia wolnych rodników tlenowych. Próbowałam oceniać, czy zabieg hemodializy zmienia właściwości surowicy na tyle, że w mniejszym stopniu indukuje generację wolnych rodników w śródbłonku. Jednak wyniki moich doświadczeń *in vitro* nie potwierdzają tej hipotezy.

Jak dotąd istnieją nieliczne dane na temat wpływu przewlekłej choroby nerek oraz hemodializy na czynność komórek śródbłonka. Celem oceny stanu czynnościowego komórek w niniejszej pracy użyto pomiaru aktywności proliferacyjnej komórek w badaniach *in vitro*. Serradel i wsp. wykazali, że surowica chorych z mocznicą nasila proliferację komórek śródbłonka, ale nie powoduje indukcji apoptozy [129]. W moich badaniach wykazałam, że stymulacja proliferacji komórek śródbłonka była silniejsza podczas ekspozycji na surowice

uzyskane po zabiegu hemodializy. Może to wynikać z faktu usunięcia podczas zabiegu hemodializy potencjalnie szkodliwych w stosunku do komórek śródbłonna toksycznych metabolitów. Podobne wyniki przedstawił Zafeiropoulou i wsp. [130]. Zaobserwował zwiększenie proliferacji pod wpływem surowicy pobranej od chorych po zabiegu w porównaniu z surowicą sprzed zabiegu.

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach oceniałam dodatkowo wpływ surowicy uzyskanej od chorych przed oraz po zakończeniu zabiegu hemodializy na syntezę *in vitro* opisanych już wcześniej markerów stanu zapalnego, takich jak IL-6 oraz MCP-1. Wykazałam istotny wzrost stymulacji syntezy chemokiny MCP-1 w komórkach śródbłonna eksponowanych na surowice otrzymane od chorych po zakończeniu hemodializy. Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają inni badacze. Stinghen i wsp. również oceniali wpływ surowicy pacjentów z przewlekłą chorobą nerek na syntezę chemokiny MCP-1 w hodowli komórek śródbłonna *in vitro*. Ekspozycja komórek śródbłonna na surowicę chorych z mocznicą skutkowałą zwiększeniem ekspresji MCP-1 wraz ze stopniem zaawansowania choroby nerek oraz czasem jej trwania [76]. Wysłunięte przez badaczy wnioski mogą sugerować związek pomiędzy aktywacją komórek śródbłonna, ogólnoustrojowym stanem zapalnym oraz toksycznością mocznicy [76].

Nie zaobserwowałam wpływu rodzaju użytego do hemodializy dostępu naczyniowego (cewnik dializacyjny lub przetoka tętniczo-żylna) na nasilenie odczynu zapalnego i stresu oksydacyjnego u badanych pacjentów. Nie odnotowałam także zależności pomiędzy wskaźnikiem wydajności dializy Kt/V a stężeniami markerów stanu zapalnego oraz stresu oksydacyjnego.

Podsumowując, należy stwierdzić, że hemodializa powoduje nasilenie wewnątrznaczyniowego odczynu zapalnego, czego wykładnikiem może być wzrost wartości w surowicy MCP-1, HGF i Pentraksyny-3 oraz zwiększona synteza MCP-1 w komórkach

śródbłónka pod wpływem surowicy uzyskanej po hemodializie. Jednocześnie dochodzi do obniżenia stężeń karbonylowanych białek w surowicy oraz ADMA, co może poprawiać zdolność komórek śródbłónka do produkcji tlenu azotu. Usuwanie toksycznych produktów przemiany materii podczas zabiegu hemodializy wpływa korzystnie na funkcjonowanie całego organizmu. Poprawie ulega również stan czynnościowy śródbłónka, czego wykładnikiem jest jego zwiększona zdolność do proliferacji. Można założyć, że idealny zabieg hemodializy powinien w jak najmniejszym stopniu indukować odczyn zapalny i stres oksydacyjny, z równoczesną eliminacją z organizmu toksycznych metabolitów. Zastosowanie bardziej biozgodnych błon dializacyjnych może zbliżyć nas do tego celu.

## 8. WNIOSKI

1. Zabieg hemodializy powoduje nasilenie wewnątrznaczyniowego odczynu zapalnego o czym świadczy wzrost stężenia MCP-1, HGF oraz PTX-3 po hemodializie.
2. Podczas zabiegu hemodializy dochodzi do obniżenia stężenia karbonylowanych białek oraz analogu argininy ADMA w surowicy, co może mieć korzystny wpływ na funkcję komórek śródbłónka.
3. Hemodializa potencjalnie poprawia stan czynnościowy śródbłónka naczyniowego, czego wykładnikiem może być zwiększona zdolność komórek śródbłónka do proliferacji w hodowli *in vitro* podczas ich ekspozycji na surowicę uzyskaną po zabiegu hemodializy.
4. Wzrost syntezy MCP-1 przez komórki śródbłónka w hodowli *in vitro* eksponowane na surowice uzyskane po hemodializie sugeruje nasilenie reakcji zapalnej wywołanej zabiegiem hemodializy

## 9. STRESZCZENIE

Chorzy ze schyłkową niewydolnością nerek poddawani zabiegowi hemodializy narażeni są na zwiększone ryzyko zachorowania oraz zgonu z powodu chorób układu krążenia. Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego jest jednym z mechanizmów przyczyniających się do powstania miażdżycy, a następnie chorób układu sercowo-naczyniowego. Czynniki wpływające na dysfunkcję śródbłonna naczyniowego wśród hemodializowanych chorych nadal pozostają niejasne.

Celem badań przeprowadzonych w niniejszej pracy była ocena wpływu zabiegu hemodializy na właściwości surowicy oraz wyjaśnienie, w jakim stopniu w warunkach hodowli *in vitro* ekspozycja komórek śródbłonna na surowicę hemodializowanych chorych powoduje zmianę ich czynności. Badany był odczyn zapalny, stres oksydacyjny, a także stężenia produktów przemiany tlenu azotu w surowicy chorych hemodializowanych.

Badaniem objęto 42 chorych, w tym 13 kobiet i 29 mężczyzn, w wieku  $63 \pm 16$  lat, leczonych przewlekłe hemodializami z powodu schyłkowej niewydolności nerek. Jako materiału do badań i eksperymentu użyto krwi pobranej przed i po zakończeniu drugiej hemodializy w tygodniu. Aby ocenić nasilenie odczynu zapalnego oraz stresu oksydacyjnego, oznaczano stężenia Interleukiny-6 (IL-6), Białka Chemotaktycznego dla Monocytów (MCP-1), Czynnika Wzrostu Śródbłonna Naczyń (VEGF), Czynnika Wzrostu Hepatocytów (HGF), asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA), Pentraksyny-3 (PTX-3), białka karbonylowanego, analizowano również stężenia produktów metabolizmu tlenu azotu (azotynów/azotanów).

Następnie prowadzone *in vitro* hodowle ludzkich komórek śródbłonna poddano ekspozycji na surowicę chorych hemodializowanych. Badano proliferację komórek

śródbłónka, oznaczano wewnątrzkomórkową generację wolnych rodników, a także oceniano syntezę IL-6 oraz MCP-1.

Pojedynczy zabieg hemodializy powodował zmiany właściwości surowicy badanych chorych. Stwierdzono znaczny wzrost stężenia MCP-1 (+17%,  $p < 0,002$ ), HGF (+91%,  $p < 0,0001$ ), PTX-3 (+39%,  $p < 0,001$ ) po hemodializie. Nie odnotowano natomiast istotnych różnic w stężeniu IL-6, VEGF przed oraz po zabiegu. Obserwowano istotne zmniejszenie stężenia białka karbonylowanego (-46%,  $p < 0,001$ ) oraz ADMA (-25%,  $p < 0,0001$ ) po zabiegu hemodializy. Podobnym zmianom uległy również wartości azotynów/azotanów (-62%,  $p < 0,001$ ) w surowicy badanych poddawanych hemodializie.

Nie wykazano istotnie różnej generacji wolnych rodników w komórkach śródbłónka w warunkach hodowli *in vitro* eksponowanych na surowicę pobraną przed oraz po zabiegu hemodializy. Natomiast proliferacja komórkowa była szybsza (+10%,  $p < 0,001$ ) podczas ekspozycji na surowicę otrzymaną po hemodializie. Obserwowano większą syntezę chemokiny MCP-1 (+ 11%,  $p < 0,005$ ) w komórkach śródbłónka eksponowanych na surowice uzyskane po zakończeniu hemodializy.

Wnioski: Zabieg hemodializy powoduje nasilenie stanu zapalnego. Jednocześnie jednak obserwowano zmniejszenie stężeń czynników potencjalnie działających supresyjnie na komórki śródbłónka, jak białka karbonylowane czy ADMA. Ponadto komórki eksponowane na surowicę po dializie wykazywały większą zdolność do proliferacji. Obserwowana nasiloną synteza MCP-1 przez komórki śródbłónka po zabiegu potwierdza efekt zapalny hemodializy.

Uzyskane wyniki dowodzą, że hemodializa nie jest w pełni biozgodną terapią nerkozastępczą, jednak usuwanie podczas tego zabiegu toksyn zmniejsza cytotoksyczność surowicy w stosunku do komórek śródbłónka.

## 10. SUMMARY

Patients with advanced chronic kidney disease undergoing hemodialysis have an increased risk of cardiovascular morbidity and mortality. Endothelial dysfunction is one of the mechanism that exacerbates atherosclerosis and leads to cardiovascular disease. The factors induced in pathogenesis of endothelial dysfunction in hemodialysed patients are still unclear.

The aim of the present study was to test the influence of hemodialysis on properties of serum and to evaluate the effect of exposure to hemodialysed patient's serum on function of human vascular endothelial cells cultured in *in vitro* conditions. Markers of inflammatory state, oxidative stress and concentrations of nitric oxide metabolism products were studied in the serum of hemodialysed patients.

Forty two patients with end-stage renal disease undergoing maintenance hemodialysis were studied (13 were female, 29 were male). The experiments and studies were conducted on blood taken after the second hemodialysis in the week. The mean age of the patients was  $63 \pm 16$  years. Concentrations of Interleukin-6 (IL-6), Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Hepatocyte Growth Factor (HGF), asymmetric dimethylarginine (ADMA), Pentraxin-3 (PTX-3) and carbonyl protein were tested to assess the inflammatory state and oxidative stress. There were also analyzed levels of nitric oxide (NO) metabolism products (nitrite/nitrate).

In the next step of my research human vascular endothelial cells cultured in *in vitro* environment were exposed on serum of hemodialysed patients. The proliferation of endothelial cells, intracellular generation of free radicals and synthesis of IL-6, MCP-1 in endothelial cells were studied.

There were found some changes in serum of patients after single session of hemodialysis, but not uniformly. Markedly higher levels of MCP-1 (+17%,  $p < 0,002$ ), HGF



(+91%,  $p < 0,0001$ ), PTX-3 (+39%,  $p < 0,001$ ) were studied after the procedure. No changes in IL-6, VEGF concentrations before and after hemodialysis were recorded. Significantly lower concentrations of carbonyl protein (-46%,  $p < 0,001$ ) and ADMA (-25%,  $p < 0,0001$ ) after hemodialysis were observed. The same changes in nitrite/nitrate levels (-62%,  $p < 0,001$ ) were found in serum of studied patients.

The generation of free radicals wasn't different in endothelial cells in *in vitro* environment exposed on serum of hemodialysed patients before and after hemodialysis. Proliferation of endothelial cells was significantly faster during the exposition on serum obtained after the procedure (+10%,  $p < 0,001$ ). There was observed significantly higher synthesis of chemokine MCP-1 (+ 11%;  $p < 0,005$ ) in endothelial cells exposed on serum of patients received after hemodialysis.

This study shows, that even single session of hemodialysis can induce inflammatory state and oxidative stress. However, this procedure diminishes the levels of factors potentially suppressive for endothelial cells, such as carbonyl protein or ADMA. Proliferation of endothelial cells was significantly faster during the exposition on serum obtained after the procedure. Enhanced synthesis of MCP-1 by this cells confirms inflammatory effect of hemodialysis.

Results demonstrate that hemodialysis is not completely biocompatible renal replacement therapy, but the removal of toxins during this procedure can diminish cytotoxicity of serum for endothelial cells.

## 11. PIŚMIENNICTWO

- 1) Diaz-Buxo J.A., Woods H.F.: *Protecting the endothelium: a new focus of management of chronic kidney disease*. Hemodial Int. 2006; 10: 42-48.
- 2) Cheung A.K., Sarnak M.J., Yan G. i wsp.: *Cardiac diseases in maintenance hemodialysis patients: Results of the HEMO Study*. Kidney Int. 2004; 65: 2380-2389.
- 3) Matsuoka H.: *Endothelial dysfunction associated with oxidative stress in human*. Diabetes Res Clin Pract. 2001; 54: 65-72.
- 4) Fiorillo C., Oliviero C., Rizzuti G. i wsp.: *Oxidative stress and antioxidant defenses in renal patients receiving regular haemodialysis*. Clin Chem Lab Med. 1998; 36: 149-153.
- 5) Malliaraki N., Mpliamplias D., Kampa M. i wsp.: *Total and corrected antioxidant capacity in hemodialyzed patients*. BMC Nephrol. 2003; 4: 1-8.
- 6) Recio-Mayoral A., Banerjee D., Streater C., Kaski J.C.: *Endothelial dysfunction, inflammation and atherosclerosis in chronic kidney disease – a cross-sectional study of predialysis, dialysis and kidney-transplantation patients*. Atherosclerosis 2011; 216: 446-451.
- 7) Schwartz U., Buzello M., Ritz E. i wsp.: *Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure*. Nephrol Dial Transplant. 2000; 15: 218-223.
- 8) Errakonda P.R., Paladugu R., Bitla A.R. i wsp.: *Effect of a single hemodialysis session on endothelial dysfunction*. J Nephrol. 2011; 24: 83-90.
- 9) Małyszko J.: *Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease*. Clin Chim Acta. 2010; 411: 1412-1420.
- 10) Haller H.: *Endothelial function. General considerations*. Drugs 1997; 53: 1-10.
- 11) Sato Y.: *Current Understanding of the Biology of Vascular Endothelium*. Cell Struct Funct. 2001; 26: 9-10.

- 12) Obońska K., Grąbczewska Z., Fisz J.: *Ocena czynności śródbłonna naczyniowego – gdzie jesteśmy, dokąd zmierzamy?* Folia Cardiologica Excerpta 2010: 5: 292-297.
- 13) Gryglewski R.J., Botting R.M., Vane J.R.: *Mediators produced by the endothelial cell.* Hypertension 1988: 12: 530-48.
- 14) Celermajer D.S.: *Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible?* J Am Coll Cardiol. 1997: 30: 325-33.
- 15) Wnuczko K., Szczepański M.: *Śródbłonek - charakterystyka i funkcje.* Pol Merk Lek. 2007: 133: 60-65.
- 16) Doroszko A., Andrzejak R., Szuba A.: *Dysfunkcja śródbłonna i ADMA w patogenezie nadciśnienia tętniczego.* Nadciśnienie tętnicze 2008: 3: 224-237.
- 17) Neubauer-Geryk J., Bieniaszewski L.: *Metody oceny funkcji śródbłonna. Wazodylatacja tętnicy ramiennej po niedokrwieniu.* Choroby Serca i Naczyń 2007: 4: 190-196.
- 18) Levin E.R.: *Endothelins.* N Engl J Med. 1995: 333: 356-363.
- 19) Dobrek L., Thor P.: *Antagoniści endoteliny i ich znaczenie w farmakoterapii.* Pol Merk Lek., 2010: 167: 404-406.
- 20) Ley K.: *Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process.* Cardiovasc Res. 1996: 32: 733-42.
- 21) Kunz K., Petitjean P., Mohamed L. i wsp.: *Cardiovascular morbidity and endothelial dysfunction in chronic haemodialysis patients: is homocysteine the missing link?* Nephrol Dial Transplant. 1999: 14: 1934-1942.
- 22) Bolton C.H., Downs L.G., Victory J.G.G. i wsp.: *Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines.* Nephrol Dial Transplant. 2001: 16: 1189-1197.

- 23) Borawski J., Naumnik B., Pawlak K. i wsp.: *Endothelial dysfunction marker von Willebrand factor antigen in haemodialysis patients: associations with pre-dialysis blood pressure and the acute phase response*. Nephrol Dial Transplant. 2001; 16: 1442-1447.
- 24) Papayianni A., Alexopoulos E., Giamalis P. i wsp.: *Circulating levels of ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 are increased in haemodialysis patients: association with inflammation, dyslipidemia, and vascular events*. Nephrol Dial Transplant. 2002; 17: 435-441.
- 25) Sumino H., Sato K., Sakamaki T. i wsp.: *Reduced production of nitric oxide during haemodialysis*. J of Human Hypertension 1999; 13: 437-442.
- 26) Raj D.S., Vincent B., Simpson K. i wsp.: *Hemodynamic changes during hemodialysis: role of nitric oxide and endothelin*. Kidney Int. 2002; 61: 697-704.
- 27) Sibal L., Aldibbiat A., Agarwal S.C. i wsp.: *Circulating endothelial progenitor cells, endothelial function, carotid intima-media thickness and circulating markers of endothelial dysfunction in people with type 1 diabetes without macrovascular disease or microalbuminuria*. Diabetologia 2009; 52: 1464-73.
- 28) Miyazaki K., Matsuko H., Itabe H. i wsp.: *Hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress*. Circulation 2000; 101: 1002-1006.
- 29) Hewitson C.L., Whiting M.J., Barbara J.A. i wsp.: *Acute effects of haemodialysis on biochemical modulators of endothelial function*. J Intern Med. 2007; 262: 571-580.
- 30) Neubauer-Geryk J., Bieniaszewski L.: *Metoda oceny funkcji śródbłonna. Wazodylatacja tętnicy ramiennej po niedokrwieniu*. Choroby Serca i Naczyń 2007; 4: 190-196.
- 31) Hamilton S.J., Chew G.T., Watts G.F.: *Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus*. Diabetes and Vascular Disease Research 2007; 4: 89-102.
- 32) Obońska K., Grąbczewska Z., Fisz J., Kubica J.: *Cukrzyca i dysfunkcja śródbłonna - krótkie spojrzenie na złożony problem*. Folia Cardiologica Excerpta 2011; 6: 109-116.

- 33) Meyer C., Heiss C., Drexhage C. i wsp.: *Hemodialysis-Induced Release of Hemoglobin Limits Nitric Oxide Bioavailability and Impairs Vascular Function*. JACC Cardiovasc Interv. 2010: 55: 454-459.
- 34) Weinstein T., Chagnac A., Korzets A. i wsp.: *Haemolysis in haemodialysis patients: evidence of impaired defence mechanisms against oxidative stress*. Nephrol Dial Transplant. 2000: 15: 883-887.
- 35) Goldstein S.L., Currier H., Watters L. i wsp.: *Acute and chronic inflammation in pediatric patients receiving hemodialysis*. J Pediatr. 2003: 143: 653-7.
- 36) Morena M., Cristol J.P., Dantoine T. i wsp.: *Protective effects of high-density lipoprotein against oxidative stress are impaired in haemodialysis patients*. Nephrol Dial Transplant. 2000: 15: 389-395.
- 37) Amore A., Bonaudo R., Ghigo D. i wsp.: *Enhanced production of nitric oxide by blood-dialysis membrane interaction*. J Am Soc Nephrol. 1995: 6: 1278-1283.
- 38) Donadee C.L., Gladwin M.T.: *Hemodialysis Hyperhemolysis. A Novel Mechanism of Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Risk?* JACC Cardiovasc Interv. 2010: 55: 460-462.
- 39) Rother R.B., Bell L., Hillmen P., Gladwin M.T.: *The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease*. JAMA. 2005: 293: 1653-62.
- 40) Morena M., Cristol J.P., Canaud B.: *Why hemodialysis patients are in a prooxidant state? What could be done to correct the pro/antioxidant imbalance?* Blood Purif. 2000: 18: 191-199.
- 41) Nguyen-Khoa T., Massy Z.A., De Bandt J.P. i wsp.: *Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment*. Nephrol Dial Transplant. 2001: 16: 335-340.

- 42) Valentini J., Grotto D., Paniz C. i wsp.: *The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients*. Biomed Pharmacother. 2008; 62: 378-382.
- 43) Mallamaci F., Zoccali C., Tripepi G. i wsp.: *Hyperhomocysteinemia predicts cardiovascular outcomes in hemodialysis patients*. Kidney Int. 2002; 61: 609-614.
- 44) Erdbruegger U., Haubitz M., Woywodt A.: *Circulating endothelial cells: A novel marker of endothelial damage*. Clin Chim Acta. 2006; 373: 17-26.
- 45) Koc M., Richards H.B., Bihorac A. i wsp.: *Circulating endothelial cells are associated with future vascular events in hemodialysis patients*. Kidney Int. 2005; 67: 1078-1083.
- 46) Koc M., Bihorac A., Segal M.: *Circulating endothelial cells as potential markers of state of the endothelium in hemodialysis patients*. Am J Kidney Dis. 2003; 42: 704-712.
- 47) Westerweel P.E., Hofer I.E., Blankestijn P.J. i wsp.: *End-stage renal disease causes an imbalance between endothelial and smooth muscle progenitor cells*. Am J Physiol Renal Physiol. 2007; 292: 1132-1140.
- 48) Jourde-Chiche N., Dou L., Sabatier F. i wsp.: *Levels of circulating endothelial progenitor cells are related to uremic toxins and vascular injury in hemodialysis patients*. J Thromb Haemost. 2009; 7: 1576-1584.
- 49) Faure V., Dou L., Sabatier F. i wsp.: *Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure*. J Thromb Haemost. 2006; 4: 566-573.
- 50) Amabile N., Guerin A.P., Leroyer A. i wsp.: *Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure*. J Am Soc Nephrol. 2005; 16: 3381-3388.
- 51) Hyadar A.A., Hujairi N.M.A., Covic A.A. i wsp.: *Coronary artery calcification is related to coronary atherosclerosis in chronic renal disease patients: a study comparing EBCT-*

- generated coronary artery calcium scores and coronary angiography. Nephrol Dial Transplant. 2004; 19: 2307-2312.*
- 52) Kurnatowska I., Grzelak P., Stefańczyk L. i wsp.: *Tight relations between coronary calcification and atherosclerotic lesions in the carotid artery in chronic dialysis patients. Nephrology 2010; 15: 184-189.*
- 53) Braun J., Oldendorf M., Mosphege W. i wsp.: *Electron beam computed tomography in the evaluation of cardiac calcification in chronic dialysis patients. Am J Kidney Dis. 1996; 27: 394-401.*
- 54) Goodman W.G., Goldin J., Kuizon B.D. i wsp.: *Coronary artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. N Engl J Med. 2000; 342: 1478-1483.*
- 55) Goldsmith D.J., Covic A., Sambrook P.A. i wsp.: *Vascular calcification in long-term haemodialysis patients in a single unit: a retrospective analysis. Nephron. 1997; 77: 37-43.*
- 56) Cohen D.L., Townsend R.R.: *Large and Small Artery Compliance Changes During Hemodialysis. Am J Hypertens. 2002; 15: 236-239.*
- 57) Bonnefont-Rousselot D., Lehmann E., Jaudon M.C. i wsp.: *Blood oxidative stress and lipoprotein oxidizability in haemodialysis patients: effect of the use of a vitamin E-coated dialysis membrane. Nephrol Dial Transplant. 2000; 15: 2020-2028.*
- 58) Descamps-Latscha B., Drueke T., Witko-Sarsat V.: *Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. Semin Dial. 2001; 14: 193-199.*
- 59) Kosch M., Levers A., Fobker M. i wsp.: *Dialysis filter type determines the acute effect of haemodialysis on endothelial function and oxidative stress. Nephrol Dial Transplant. 2003; 18: 1370-1375.*
- 60) Kosch M., Levers A., Barenbrock M., i wsp.: *Acute effects of haemodialysis on endothelial function and large artery elasticity. Nephrol Dial Transplant. 2001; 16: 1663-1668.*

- 61) Hand M.F., Haynes W.G., Webb D.J. i wsp.: *Hemodialysis and L-arginine, but not D-arginine, correct renal failure-associated endothelial dysfunction.* *Kidney Int.* 1998; 53: 1068-1077.
- 62) Cross J.M., Donald A., Vallance P.J. i wsp.: *Dialysis improves endothelial function in humans.* *Nephrol Dial Transplant.* 2001; 16: 1823-1829.
- 63) Pupim L.B., Himmelfarb J., McMonagle E. i wsp.: *Influence of initiation of maintenance hemodialysis on biomarkers of inflammation and oxidative stress.* *Kidney Int.* 2004; 65: 2371-2379.
- 64) Varan H.I., Dursun B., Dursun E. i wsp.: *Acute effects of hemodialysis on oxidative stress parameters in chronic uremic patients: comparison of two dialysis membranes.* *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2010; 3: 39-45.
- 65) Malaponte G., Libra M., Bevelacqua Y. i wsp.: *Inflammatory status in patients with chronic renal failure: the role of PTX3 and pro-inflammatory cytokines.* *Int J Mol Med.* 2007; 20: 471-481.
- 66) Himmelfarb J., Stenvinkel P., Ikizler T.A. i wsp.: *The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia.* *Kidney Int.* 2002; 62:1524-1538.
- 67) Becker B.N., Himmelfarb J., Henrich W.L. i wsp.: *Reassessing the cardiac risk profile in chronic hemodialysis patients: a hypothesis on the role of oxidant stress and other non-traditional cardiac risk factors.* *J Am Soc Nephrol.* 1997; 8: 475-86.
- 68) Jie K.E., Zaikova M.A., Bergevoet M.W. i wsp.: *Progenitor cells and vascular function are impaired in patients with chronic kidney disease.* *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25: 1875-82.
- 69) Deanfield J.E., Halcox J.P., Rabelink T.J.: *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance.* *Circulation.* 2007; 115: 1285-95.
- 70) Verma S., Anderson T.J.: *Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist.* *Circulation.* 2002; 105: 546-549.



- 71) Yamamoto T., Nascimento M.M., Hayashi S.Y. i wsp.: *Changes in circulating biomarkers during a single hemodialysis session*. Hemodial Int. 2013; 17: 59-66.
- 72) Caglar K., Peng Y., Pupim L.B. i wsp.: *Inflammatory signals associated with hemodialysis*. Kidney Int. 2002; 62: 1408-1416.
- 73) Del Vecchio L., Locatelli F., Carini M.: *What we know about oxidative stress in patients with chronic kidney disease on dialysis - clinical effects, potential treatment, and prevention*. Semin Dial. 2011; 24: 56-64.
- 74) Li P., Garcia G.E., Xia Y. i wsp.: *Blocking of monocyte chemoattractant protein-1 during tubulointerstitial nephritis resulted in delayed neutrophil clearance*. Am J Pathol. 2005; 167: 637-649.
- 75) Deshmane S.L., Kremlev S., Amini S. i wsp.: *Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An overview*. J Interferon Cytokine Res. 2009; 29: 313-326.
- 76) Stinghen A.E., Gonçalves S.M., Martines E.G. i wsp.: *Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease*. Nephron Clin Pract. 2009; 111: 117-26.
- 77) Stenvinkel P., Alvestrand A.: *Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy*. Semin Dial. 2002; 15: 329-337.
- 78) Witowski C.J.: *Mechanizmy regulujące syntezę interleukiny-6 w komórkach mezotelium otrzewnowego w warunkach dializy otrzewnowej*. Praca habilitacyjna, Katedra i Zakład Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2000 r.
- 79) Dubiński A., Zdrojewicz Z.: *Rola interleukiny-6 w wystąpieniu i progresji miażdżycy*. Pol. Merk. Lek. 2007; 12: 291-294.
- 80) Łukaszewicz M., Mroczko B., Szmitkowski M.: *Znaczenie kliniczne interleukiny 6 (IL-6) jako czynnika rokowniczego w chorobie nowotworowej*. Pol Arch Med Wewn. 2007; 117: 247-251.

- 81) Oberg B.P., McMennamin E., Lucas F.L. i wsp.: *Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease*. *Kidney Int.* 2004; 65: 1009-1016.
- 82) Kato A., Odamaki M., Takita T. i wsp.: *Association between interleukin-6 and carotid atherosclerosis in hemodialysis patients*. *Kidney Int* 2002; 61: 1143-1152.
- 83) Tarakçioğlu M., Erbağcı A.B., Usalan C. i wsp.: *Acute effect of hemodialysis on serum levels of the proinflammatory cytokines*. *Mediators Inflamm.* 2003; 12: 15-29.
- 84) Tong M., Carrero J.J., Qureshi A.R. i wsp.: *Plasma pentraxin 3 in patients with chronic kidney disease: associations with renal function, protein-energy wasting, cardiovascular disease, and mortality*. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 889-897.
- 85) Daugirdas J.T., Blake P.G., Ing T.S.: *Podręcznik dializoterapii*. Wydanie II. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2008.
- 86) Rutkowski B.: *Leczenie nerkozastępcze*. Wydanie I. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2007.
- 87) Rutkowski B.: *Dializoterapia w praktyce lekarskiej*. Wydanie III. MAKmedia, Gdańsk 2004.
- 88) Libetta C., Esposito P., Sepe V. i wsp.: *Acute kidney injury: effect of hemodialysis membrane on Hgf and recovery of renal function*. *Clin Biochem.* 2013; 46: 103-108.
- 89) Rampino T., Libetta C., De Simone W. i wsp.: *Hemodialysis stimulates hepatocyte growth factor release*. *Kidney Int.* 1998; 53: 1382-1388.
- 90) Borawski J., Myśliwiec M.: *Niektóre czynniki wzrostowe a choroby układu krążenia u pacjentów hemodializowanych*. *Pol Merk Lek.* 2006; 122: 117-118.
- 91) Yanagita K., Nagaike M., Ishibashi H. i wsp.: *Lung may have an endocrine function producing hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 182: 802-809.
- 92) Sugimura K., Kim T., Goto T. i wsp.: *Serum hepatocyte growth factor levels in patients with chronic renal failure*. *Nephron.* 1995; 70: 324-328. abstrakt.

- 93) Lohr J.W., Lee T.P., Farooqui M. i wsp.: *Increased levels of serum hepatocyte growth factor in patients with end-stage renal disease*. J Med. 2000; 31: 131-141. abstrakt.
- 94) Malatino L.S., Mallamaci F., Benedetto F.A. i wsp.: *Hepatocyte growth factor predicts survival and relates to inflammation and intima media thickness in end-stage renal disease*. Am J Kidney Dis. 2000; 36: 945-952.
- 95) Makowiecka M., Zwolińska D., Kiliś-Pstrusińska K.: *The role of Vascular Endothelial Growth Factor in Pathogenesis of Glomerulonephritis*. Adv Clin Exp Med 2006; 15: 889-895.
- 96) Zachary I., Glikli G.: *Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family*. Cardiovasc Res. 2001; 49: 568-581.
- 97) Young P.P., Hofling A.A., Sands M.S.: *VEGF increases engraftment of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) into vasculature of newborn murine recipients*. Proc Natl Acad Sci. 2002; 99: 11951-11956.
- 98) Kang D.H., Anderson S., Kim Y.G. i wsp.: *Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin -1 in renal disease*. Am J Kidney Dis 2001; 37: 601-611.
- 99) Wątopek E., Paprocka M., Duś D. i wsp.: *Endostatin and vascular endothelial growth factor: potential regulators of endothelial progenitor cell number in chronic kidney disease*. Pol Arch Med Wewn. 2011; 121: 296-301.
- 100) Harper S.J., Downs L., Tomson C.R. i wsp.: *Elevated plasma vascular endothelial growth factor levels in non-diabetic predialysis uremia*. Nephron. 2002; 90: 341-343.
- 101) Futrakul N., Butthep P., Laohareungpanya N. i wsp.: *A defective angiogenesis in chronic kidney disease*. Ren Fail. 2008; 30: 215-217.

- 102) Hamed E.A., El-Abaseri T.B., Mohamed A.O. i wsp.: *Hypoxia and oxidative stress markers in pediatric patients undergoing hemodialysis: cross section study*. BMC Nephrol. 2012; 13: 136-143.
- 103) Chen Y.T., Cheng B.C., Ko S.F. i wsp.: *Value and level of circulating endothelial progenitor cells, angiogenesis factors and mononuclear cell apoptosis in patients with chronic kidney disease*. Clin Exp Nephrol. 2013; 17: 83-91.
- 104) Pawlak K, Pawlak D, Mysliwiec M.: *Impaired renal function and duration of dialysis therapy are associated with oxidative stress and proatherogenic cytokine levels in patients with end-stage renal disease*. Clin Biochem. 2007; 40: 81-85.
- 105) Pawlak K, Pawlak D, Mysliwiec M.: *Possible association between circulating vascular endothelial growth factor and oxidative stress markers in hemodialysis patients*. Med Sci Monit. 2006; 12: 181-185.
- 106) Schlieper G., Hristov M., Brandenburg V. i wsp.: *Predictors of low circulating endothelial progenitor cell numbers in haemodialysis patients*. Nephrol Dial Transplant. 2008; 23: 2611-2618.
- 107) Herbrig K., Pistrosch F., Oelschlaegel U. i wsp.: *Increased total number but impaired migratory activity and adhesion of endothelial progenitor cells in patients on long-term hemodialysis*. Am J Kidney Dis. 2004; 44: 840-849.
- 108) Pawlak K, Mysliwiec M, Pawlak D.: *Oxidative stress, phosphate and creatinine levels are independently associated with vascular endothelial growth factor levels in patients with chronic renal failure*. Cytokine. 2008; 43: 98-101.
- 109) Eizawa T., Murakami Y., Matsui K. i wsp.: *Circulating endothelial progenitor cells are reduced in hemodialysis patients*. Curr Med Res Opin. 2003;19: 627-633.

- 110) Böger R.H., Sydow K., Borlak J. i wsp.: *LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases*. *Circ Res*. 2000; 87: 99-105.
- 111) Boehme M., Kaehne F., Kuehne A. i wsp.: *Pentraxin 3 is elevated in haemodialysis patients and is associated with cardiovascular disease*. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22: 2224-2229.
- 112) Suliman M.E., Qureshi A.R., Carrero J.J. i wsp.: *The long pentraxin PTX-3 in prevalent hemodialysis patients: associations with comorbidities and mortality*. *QJM*. 2008; 101: 397-405.
- 113) Panichi V., Scatena A., Migliori M. i wsp.: *Biomarkers of chronic inflammatory state in uremia and cardiovascular disease*. *Int J Inflam*. 2012; 2012: 1-6.
- 114) Peri G., Inrona M., Corradi D. i wsp.: *PTX3, A prototypical long pentraxin is an early indicator of acute myocardial infarction in humans*. *Circulation*. 2000; 102: 636-641.
- 115) Albarello K., dos Santos G.A., Bochi G.V. i wsp.: *Ischemia modified albumin and carbonyl protein as potential biomarkers of protein oxidation in hemodialysis*. *Clin Biochem*. 2012; 45: 450-454.
- 116) Dursun E., Dursun B., Suleymanlar G., Ozben T. i wsp.: *Effect of haemodialysis on the oxidative stress and antioxidants in diabetes mellitus*. *Acta Diabetol*. 2005; 42: 123-128.
- 117) Himmelfarb J., McMonagle E., McMenamin E. i wsp.: *Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure*. *Kidney Int* 2000; 58: 2571-2578.
- 118) Mayer B., Zitta S., Greilberger J. i wsp.: *Effect of hemodialysis on the antioxidative properties of serum*. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1638: 267-272.
- 119) Zoccali C., Bode-Böger S., Mallamaci F. i wsp.: *Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study*. *Lancet*. 2001; 358: 2113-2117.

- 120) Alsagaff M.Y., Thaha M., Aminuddin M. i wsp.: *Asymmetric dimethylarginine: a novel cardiovascular risk factor in end-stage renal disease*. J Int Med Res. 2012; 40: 340-349.
- 121) Zoccali C., Benedetto F.A., Maas R. i wsp.: *Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease*. J Am Soc Nephrol. 2002; 13: 490-496.
- 122) Ravani P., Tripepi G., Malberti F. i wsp.: *Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risks modeling approach*. J Am Soc Nephrol. 2005; 16: 2449-2455.
- 123) Lu T.M., Chung M.Y., Lin C.C. i wsp.: *Asymmetric dimethylarginine and clinical outcomes in chronic kidney disease*. Clin J Am Soc Nephrol. 2011; 6: 1566-1572.
- 124) Young J.M., Terrin N., Wang X. i wsp.: *Asymmetric dimethylarginine and mortality in stages 3 to 4 chronic kidney disease*. Clin J Am Soc Nephrol 2009; 4: 1115-1120.
- 125) Kielstein J.T., Böger R.H., Bode-Böger S.M. i wsp.: *Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease*. J Am Soc Nephrol. 1999; 10: 594-600.
- 126) Clermont G., Lecour S., Lahet J. i wsp.: *Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients*. Cardiovasc Res. 2000; 47: 618-623.
- 127) Blum M., Yachnin T., Wollman Y. i wsp.: *Low nitric oxide production in patients with chronic renal failure*. Nephron 1998; 79: 265-268.
- 128) Bryan N.S., Torregrossa A.C., Mian A.I.: *Acute effects of hemodialysis on nitrite and nitrate: potential cardiovascular implications in dialysis patients*. Free Radic Biol Med. 2013; 58: 46-51. abstrakt.

- 129) Serradell M., Díaz-Ricart M., Cases A. i wsp.: *Uraemic medium accelerates proliferation but does not induce apoptosis of endothelial cells in culture*. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 1079-1085.
- 130) Zafeiropoulou K., Bitá T., Polykratis A. i wsp.: *Hemodialysis removes uremic toxins that alter the biological actions of endothelial cells*. *PLoS One*. 2012; Epub 2012 Feb 22.