

Lek. med. Alina Podkowińska

**Ocena modyfikacji białek w przewlekłej  
chorobie nerek – wybrane aspekty kliniczne  
i biochemiczne**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:

Dr hab. n. med. Dorota Formanowicz

Zakład Biochemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej

Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej

Wydział Medyczny

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2019

Pragnę serdecznie podziękować mojemu promotorowi  
Pani dr hab. n. med. Dorocie Formanowicz  
za poświęcony czas, wsparcie, motywację i pomoc.

Wyrazy podziękowania kieruję także do  
Pani prof. dr hab. n. med. Marii Wanic-Kossowskiej  
za życzliwe podejście i inspirację.

Dziękuję również Rodzicom  
za nieocenioną pomoc i wspieranie w wysiłkach.

## SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY.....	6
1. WSTĘP.....	10
1.1. PRZEWLEKŁA CHOROBA NEREK – WPROWADZENIE.....	10
1.2. STRES OKSYDACYJNY W PRZEWLEKŁEJ CHOROBI NEREK.....	11
1.2.1. WZMOŻONA SYNTEZA RFT W PRZEWLEKŁEJ CHOROBI NEREK.....	12
1.2.2. SPADEK AKTYWNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ W PRZEWLEKŁEJ CHOROBI NEREK.....	14
1.2.3. METODY LECZENIA NERKOZASTĘPCZEGO A STRES OKSYDACYJNY.....	15
1.3. MODYFIKACJE BIAŁEK W PRZEWLEKŁEJ CHOROBI NEREK.....	16
1.3.1. ZAAWANSOWANE PRODUKTY UTLENIANIA BIAŁEK .....	18
1.3.2. METYLOGLIOKSAL, KARBOKSYMETYLOLIZYNA, KARBOKSYETYLOLIZYNA, ZAAWANSOWANE PRODUKTY GLIKACJI.....	21
1.3.3. GRUPY KARBONYLOWE BIAŁEK.....	25
1.3.4. ROZPUSZCZALNA POSTAĆ RECEPTORA DLA ZAAWANSOWANYCH PRODUKTÓW GLIKACJI.....	27
1.3.5. 3-NITROTYROZYNA.....	30
1.3.6. GRUPY KARBAMYLOWE BIAŁEK.....	33
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY .....	37
3. MATERIAŁY I METODY.....	38
3.1. CHARAKTERYSTYKA GRUP BADANYCH – KWALIFIKACJA DO BADANIA.....	38
3.2. METODYKA BADAŃ.....	43
3.2.1. POBIERANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK KRWI.....	43
3.2.2. OZNACZANIE PARAMETRÓW.....	44
3.3. ANALIZA STATYSTYCZNA.....	46
4. WYNIKI.....	48

4.1. OCENA PARAMETRÓW LABORATORYJNYCH W POSZCZEGÓLNYCH GRUPACH.....	48
4.2. OCENA STĘŻENIA WYKŁADNIKÓW WYBRANYCH MODYFIKACJI BIAŁEK I ICH KORELACJI Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI W POSZCZEGÓLNYCH GRUPACH.....	51
4.2.1. OCENA STĘŻENIA AOPPs i KORELACJE STĘŻENIA AOPPs Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI.....	52
4.2.2. OCENA STĘŻENIA MG, CEL, CML I AGEs ORAZ KORELACJE ICH STĘŻENIA Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI.....	57
4.2.2.3. MG.....	57
4.2.2.2. CEL.....	63
4.2.2.3. CML.....	67
4.2.2.4. AGEs.....	72
4.2.3. OCENA STĘŻENIA GRUP KARBONYLOWYCH BIAŁEK ORAZ KORELACJE ICH STĘŻENIA Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI.....	76
4.2.4. OCENA STĘŻENIA sRAGE i KORELACJE STĘŻENIA sRAGE Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI.....	80
4.2.5. OCENA STĘŻENIA 3-NITROTYROZYNY ORAZ KORELACJE JEJ STĘŻENIA Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI.....	87
4.2.6. OCENA STĘŻENIA GRUP KARBAMYLOWYCH BIAŁEK ORAZ KORELACJE ICH STĘŻENIA Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI.....	95
5. DYSKUSJA.....	101
5.1. WYKŁADNIKI OCENIANYCH MODYFIKACJI BIAŁEK W PRZEWLEKŁEJ CHOROBIE NEREK.....	101
5.1.1. AOPPs W PRZEWLEKŁEJ CHOROBIE NEREK.....	101
5.1.2. MG, CEL, CML, AGEs W PRZEWLEKŁEJ CHOROBIE NEREK...103	
5.1.3. GRUPY KARBONYLOWE BIAŁEK W PRZEWLEKŁEJ CHOROBIE NEREK.....	106

5.1.4.	sRAGE	W	PRZEWLEKŁEJ	CHOROBIĘ	
NEREK.....					107
5.1.5.	3-NITROTYROZYNA	W	PRZEWLEKŁEJ	CHOROBIĘ	
NEREK....					110
5.1.6.	GRUPY KARBAMYLOWE BIAŁEK	W	PRZEWLEKŁEJ	CHOROBIĘ	
NEREK.....					111
5.1.7.	PORÓWNANIE KUMULACJI WYKŁADNIKÓW OCENIANYCH				
	MODYFIKACJI BIAŁEK U CHORYCH Z PRZEWLEKŁĄ CHOROBA				
	NEREK I CHORYCH Z CO NAJMNIJ 1 EPIZODEM SERCOWO-				
	NACZYNIOWYM W WYWIADZIE.....				114
5.2.	KORELACJE WYKŁADNIKÓW	MODYFIKACJI	BIAŁEK	Z	
	PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI	W	PRZEWLEKŁEJ	CHOROBIĘ	
NEREK.....					116
5.2.1.	OCENIANE	MODYFIKACJE	BIAŁEK	A	
	LABORATORYJNE				
	WYKŁADNIKI				
	NIEDOŻYWIENIA.....				116
5.2.2.	OCENIANE	MODYFIKACJE	BIAŁEK	A	
	LABORATORYJNE				
	WYKŁADNIKI STANU ZAPALNEGO.....				120
5.2.3.	OCENIANE	MODYFIKACJE	BIAŁEK	A	
	ZABURZENIA				
	GOSPODARKI				
	LIPIDOWEJ.....				124
5.2.4.	OCENIANE	MODYFIKACJE	BIAŁEK	A	
	ZABURZENIA				
	GOSPODARKI WAPNIOWO-FOSFORANOWEJ.....				131
5.2.5.	OCENIANE	MODYFIKACJE	BIAŁEK	A	
	ZABURZENIA				
	GOSPODARKI ŻELAZOWEJ.....				139
5.2.6.	POZOSTAŁE KORELACJE OCENIANYCH	MODYFIKACJI			
	BIAŁEK	Z		PARAMETRAMI	
	LABORATORYJNYMI.....				142
5.3.	GRUPY BADANYCH A ROZKŁAD	OCENIANYCH	MODYFIKACJI		
	BIAŁEK	I	ICH	KORELACJI	Z
	PARAMETRAMI				
LABORATORYJNYMI.....					144
5.3.1.				GRUPA	
PRE.....					144
5.3.2.	GRUPA DO.....				145

5.3.3. GRUPA HD.....	145
6.	
WNIOSKI.....	147
7.	
BIBLIOGRAFIA.....	148
8. STRESZCZENIE.....	176
9. SUMMARY.....	178
10.	
SPIS	RYCIN
I	
TABEL.....	180
10.1.	
RYCIN.....	180
SPIS	
10.2.	
TABEL.....	184
SPIS	

#### WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

4-HNE	4-hydroksy-2-nonenal – ang. <i>4-hydroxy-2-nonenal</i>
4-HHE	4-hydroksy-2-heksenal – ang. <i>4-hydroxy-2-hexenal</i>
4-ONE	4-okso-2-nonenal – ang. <i>4-oxo-2-nonenal</i>
8-OH-dG	8-hydroksy-2-deoksyguanozyna – ang. <i>8-hydroxy-2-deoxyguanosine</i>
ADO	automatyczna dializa otrzewnowa – ang. <i>automatic peritoneal dialysis</i>
AGEs	zaawansowane produkty glikacji – ang. <i>advanced glycation end products</i>
ALEs	zaawansowane produkty lipooksydacji – ang. <i>advanced lipoxidation end products</i>
AOPPs	zaawansowane produkty utleniania białek – ang. <i>advanced oxidation protein products</i>
apoA-I	apolipoproteina A-I – ang. <i>apolipoprotein A-I</i>
apo-B100	apolipoproteina-B100 – ang. <i>apolipoprotein B100</i>
apoC	apolipoproteina C – ang. <i>apolipoprotein C</i>

apoC-II	apolipoproteina C-II – ang. <i>apolipoprotein C-II</i>
apoC-III	apolipoproteina C-III – ang. <i>apolipoprotein C-III</i>
apoE	apolipoproteina E – ang. <i>apolipoprotein E</i>
ARP	produkty reakcji Amadori – ang. <i>Amadori rearrangement products</i>
ATP	adenozynotrifosforan – ang. <i>adenosine trisphosphate</i>
CADO	ciągła ambulatoryjna dializa otrzewnowa – ang. <i>continuous cycling peritoneal dialysis</i>
CaSR	receptor wrażliwy na wapń – ang. <i>calcium-sensing receptor</i>
CAT	katalaza – ang. <i>catalase</i>
CCA-IMT	wskaźnik „intima media” (grubość błony środkowej i wewnętrznej w tętnicy szyjnej wspólnej) – ang. <i>common carotid artery intima-media thickness</i>
CEL	karboksyetylolizyna – ang. <i>carboxyethyllysine</i>
CETP	białko przenoszące estry cholesterolu – ang. <i>cholesteryl ester transfer protein</i>
cGMP	cykliczny guanozynomonofosforan – ang. <i>cyclic guanosine monophosphate</i>
COX-2	cyklooksigenaza 2 – ang. <i>cyclooxygenase 2</i>
CML	karboksymetylolizyna – ang. <i>carboxymethyllysine</i>
cRAGE	postać cleaved receptora zaawansowanych produktów glikacji – ang. <i>cleaved receptor for advanced glycation end products</i>
CRP	białko C-reaktywne – ang. <i>C-reactive protein</i>
CSF-1	czynnik stymulujący tworzenie kolonii 1 – ang. <i>colony-stimulating factor 1</i>
dnRAGE	dominujący negatywny RAGE – <i>dominant negative receptor for advanced glycation end products</i>
EGF	czynnik wzrostu naskórka – ang. <i>epidermal growth factor</i>
eGFR	oszacowany współczynnik przesączania kłębuszkowego – ang. <i>estimated glomerular filtration rate</i>
eNOS	śródbłonkowa syntaza tlenku azotu – ang. <i>endothelial nitric oxide synthase</i>
EPO	peroksydaza eozynofilii – ang. <i>eosinophil peroxidase</i>
sS-N	pojedynczy epizod sercowo-naczyniowy – ang. <i>single cardiovascular episode</i>
esRAGE	endogenny rozpuszczalny receptor zaawansowanych produktów glikacji – <i>endogenous secretory receptor for advanced glycation end products</i>
ET-1	endotelina 1 – ang. <i>endothelin 1</i>
FGF23	czynnik wzrostu fibroblastów 23 – ang. <i>fibroblast growth factor 23</i>
GDPs	produkty degradacji glukozy – ang. <i>glucose degradation products</i>
GOLD	dimer glioksalu i lizyny – ang. <i>glyoxal-lysine dimer</i>

GPx	peroksydaza glutationowa – ang. <i>glutathione peroxidase</i>
HO <sup>•</sup>	rodnik hydroksylowy – ang. <i>hydroxyl radical</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	nadtlenek wodoru – ang. <i>hydrogen peroxide</i>
HOCl	kwask podchlorawy – ang. <i>hypochlorous acid</i>
HDL	lipoproteiny o wysokiej gęstości – ang. <i>high density lipoproteins</i>
HMW-AOPPs	wielkocząsteczkowe zaawansowane produkty utleniania białek – ang. <i>high molecular weight advanced oxidation protein products</i>
ICAM-1	cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 – ang. <i>intracellular adhesion molecule 1</i>
IDL	lipoproteiny o pośredniej gęstości – ang. <i>intermediate density protein</i>
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu – ang. <i>insulin-like growth factor 1</i>
IL	interleukina – ang. <i>interleukin</i>
INF-γ	interferon gamma – ang. <i>interferon gamma</i>
iNOS	indukowalna syntaza tlenku azotu – ang. <i>inducible nitric oxide synthase</i>
KDIGO	ang. <i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
Kt/V	wskaźnik adekwatności dializy – ang. <i>marker of dialysis adequacy</i>
LCAT	acylotransferaza lecytyna:cholesterol – ang. <i>lecithin: cholesterol acyltransferase</i>
LDL	lipoproteiny o niskiej gęstości – ang. <i>low density lipoproteins</i>
LMW-AOPPs	małocząsteczkowe zaawansowane produkty utleniania białek – ang. <i>low molecular weight advanced oxidation protein products</i>
LOX-1	receptor podobny do lektyny typu 1 wiążący ox-LDL – ang. <i>lectin like oxidized LDL receptor-1</i>
MAPK	kinazy aktywowane mitogenami – ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	białko chemotaktyczne monocytów 1 – ang. <i>monocyte chemotactic protein 1</i>
MDA	dialdehyd malonowy – ang. <i>malondialdehyde</i>
MG	metyloglioksal – ang. <i>methylglyoxal</i>
MIA	niedożywienie-zapalenie-miażdżycy – ang. <i>malnutrition-inflammation-atherosclerosis</i>
MIP	białko zapalne makrofagów – ang. <i>macrophage inflammatory protein</i>
MMP-2	metaloproteinaza 2 – ang. <i>metaloproteinase 2</i>
MOLD	dimer metyloglioksalu i lizyny – ang. <i>methylglyoxal-lysine dimer</i>
MPO	mieloperoxydaza – ang. <i>myeloperoxidase</i>



NF-κB	czynnik jądrowy κB zidentyfikowany w limfocytach B – ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NO	tlenek azotu – ang. <i>nitric oxide</i>
nNOS	neuronalna syntaza tlenku azotu – ang. <i>neuronal nitric oxide synthase</i>
Nox	oksydaza NADPH – ang. <i>NADPH oxidase</i>
NT-proBNP	N-końcowy fragment prohormonu peptydu natriuretycznego typu B – ang. <i>N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide</i>
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	anionorodnik ponadtlenkowy – ang. <i>superoxide radical</i>
ONOO <sup>-</sup>	nadtlenoazotyn ang. <i>peroxynitrite</i>
ox-LDL	utlenione lipoproteiny o niskiej gęstości – ang. <i>oxidized low density lipoproteins</i>
ox-PL	utlenione fosfolipidy – ang. <i>oxidized phospholipids</i>
PAI-1	inhibitor aktywatora plazminogenu 1 – ang. <i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PBMC	komórki jednojądrzaste krwi obwodowej – ang. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PChN	przewlekła choroba nerek – ang. <i>chronic kidney disease</i>
PCR	współczynnik katabolizmu białka – ang. <i>protein catabolic rate</i>
PDGF	płytkopochodny czynnik wzrostu – ang. <i>platelet-derived growth factor</i>
PGI <sub>2</sub>	prostacyklina – ang. <i>prostacyclin</i>
PKA	kinaza białkowa A – ang. <i>protein kinase A</i>
PKC	kinaza białkowa C – ang. <i>protein kinase C</i>
PMN	komórki wielojądrzaste – ang. <i>polymorphonuclear leukocytes</i>
PON	paraoksonaza – ang. <i>paroxonase</i>
PTH	parathormon – ang. <i>parathormon</i>
RAA	renina-angiotensyna-aldosteron - ang. <i>renine-angiotensin-aldosterone</i>
RAGE	receptor zaawansowanych produktów glikacji – ang. <i>receptor for advanced glycation end products</i>
RANK	receptor aktywujący czynnik jądrowy NF-κB – ang. <i>receptor activator of nuclear factor NF-κB</i>
RANKL	ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy NF-κB – ang. <i>ligand of receptor activator of nuclear factor NF-κB</i>
RFA	reaktywne formy azotu – ang. <i>reactive nitrogen species</i>
RFT	reaktywne formy tlenu – ang. <i>reactive oxygen species</i>
SNN	schyłkowa niewydolność nerek – ang. <i>end-stage renal disease</i>

SOD	dysmutaza ponadtlenkowa – ang. <i>superoxide dysmutase</i>
SR	receptor zmiatający – ang. <i>scavenger receptor</i>
sRAGE	rozpuszczalny receptor zaawansowanych produktów glikacji – ang. <i>soluble receptor for advanced glycation end products</i>
TF	czynnik tkankowy – ang. <i>tissue factor</i>
TGF- $\beta$	transformujący czynnik wzrostu beta – ang. <i>transforming growth factor beta</i>
TNF- $\alpha$	czynnik martwicy nowotworów alfa – ang. <i>tumor necrosis factor alfa</i>
URR	wskaźniki redukcji mocznika – ang. <i>urea reduction ratio</i>
VCAM-1	naczyniowa cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 – ang. <i>vascular adhesion molecule 1</i>
VLDL	lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości – ang. <i>very low density lipoproteins</i>
VDR	receptor dla witaminy D – ang. <i>vitamin D receptor</i>
VEGF	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego – ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>
VSMC	komórki mięśni gładkich naczyń – ang. <i>vascular smooth muscle cells</i>

## 1. WSTĘP

### 1.1. PRZEWLEKŁA CHOROBA NEREK - WPROWADZENIE

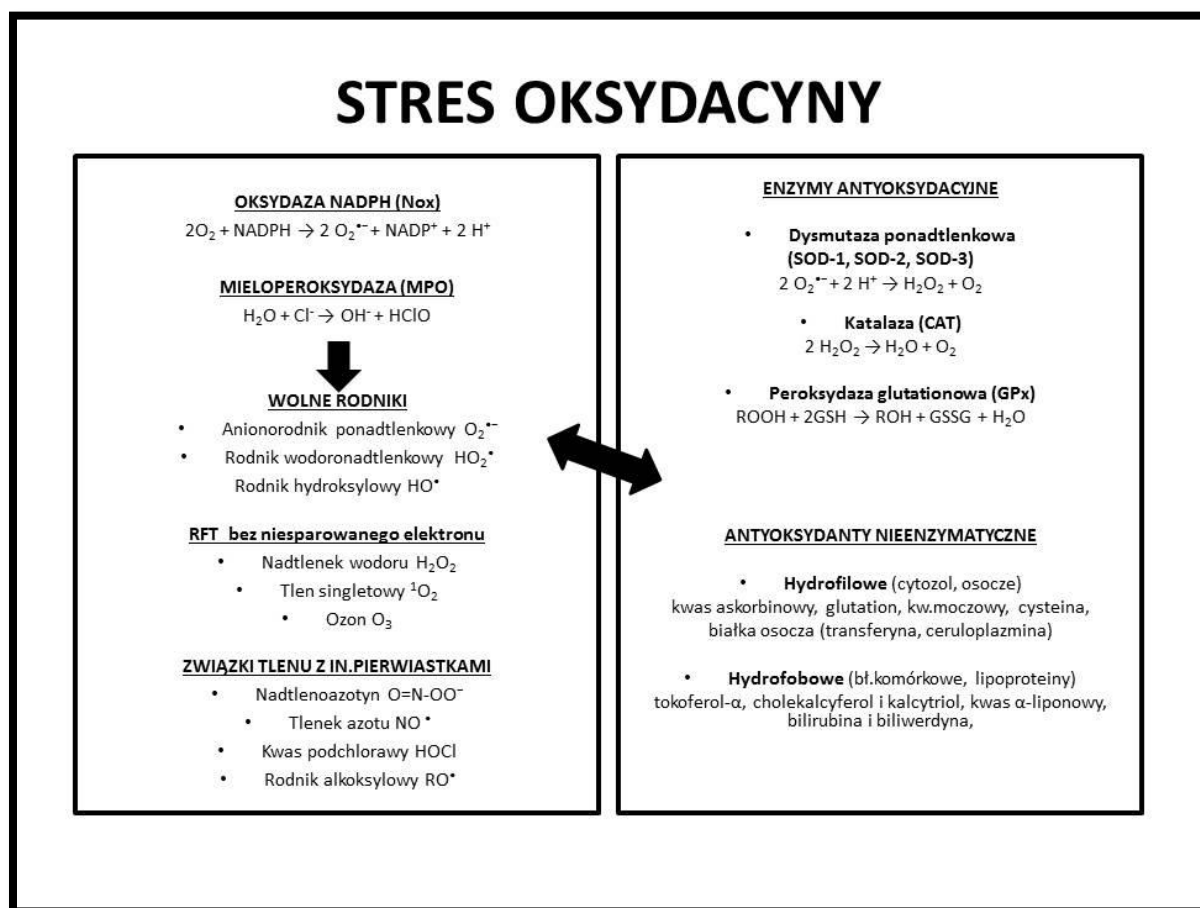
Zgodnie z wytycznymi KDIGO 2012 (ang. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) rozpoznanie przewlekłej choroby nerek (ang. *chronic kidney disease*, PChN) wymaga stwierdzenia nieprawidłowości w budowie lub czynności nerek, które mają znaczenie dla zdrowia pacjenta i utrzymują się ponad trzy miesiące [1]. Częstość występowania PChN wzrasta wraz z wiekiem i w grupie powyżej 65 r.ż. osiąga 30%. Z tego względu PChN zalicza się do grupy chorób cywilizacyjnych, których skutki są poważnym problemem społecznym [2]. Znaczący problem w tej populacji stanowi wysoki odsetek zgonów, który w najbardziej zaawansowanej postaci PChN, tj. w schyłkowej niewydolności nerek (ang. *end-stage renal disease*, SNN), sięga 15% rocznie. Najczęstszą przyczyną zgonu są choroby układu krążenia, w tym: ostry zespół wieńcowy, udar niedokrwienny mózgu, zatorowość płucna, arytmie,

infekcyjne zapalenie wsierdzia i nagła śmierć sercowa. W SNN choroby o etiologii miażdżycowej stanowią przyczynę aż 35-50% zgonów [3]. Spadek oszacowanego współczynnika przesączania kłębuszkowego (ang. *estimated glomerular filtration rate*, eGFR) o 10 ml/min/1,73m<sup>2</sup> zwiększa ryzyko chorób sercowo-naczyniowych o 5%, tak że w grupie chorych leczonych nerkozastępczo ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych jest dwadzieścia razy większe, niż w populacji ogólnej [2,5].

Patogeneza PChN jest złożona i wieloczynnikowa, zwłaszcza że do uszkodzenia czynności nerek dochodzi w wyniku wielu chorób, wśród których znajdują się zarówno choroby o podłożu autoimmunologicznym, jak i metabolicznym oraz naczyniowym i onkologicznym. Ubytkowi funkcji wydalniczej nerek towarzyszy szereg nieprawidłowości dotyczących gospodarki wodno-elektrolitowej, równowagi kwasowo-zasadowej, równowagi redox, układu hormonalnego, układu krążenia oraz regulacji osi nerki-szypik i nerki-kości. Zaburzenia homeostazy wewnątrzustrojowej doprowadzają do nieodwracalnej modyfikacji białek, lipidów, węglowodanów oraz kwasów nukleinowych, zarówno w wyniku zakłócenia szlaków metabolicznych, jak i w wyniku powstawania patologicznych związków o wysokiej reaktywności, które wchodzi w reakcje z innymi cząsteczkami. W mechanizmie dodatniego sprzężenia zwrotnego zmiana struktury, budowy i funkcji związków kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania komórek oraz narządów skutkuje dalszym postępowaniem PChN i rozwojem ogólnoustrojowych powikłań [1-4].

## 1.2. STRES OKSYDACYJNY W PRZEWLEKŁEJ CHOROBY NEREK

Jednym z czynników odpowiedzialnych za modyfikacje związków wielkocząsteczkowych w przebiegu PChN jest stres oksydacyjny, który definiuje się jako przewagę wytwarzania reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, RFT) nad procesami antyoksydacyjnymi. U chorych z PChN stres oksydacyjny doprowadza do peroksydacji lipidów oraz utleniania białek, węglowodanów i kwasów nukleinowych. Modyfikacja związków, kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania ustroju, może skutkować dalszym uszkodzeniem nerek oraz innych narządów, co niesie za sobą poważne skutki dla całego ustroju [1-4]. Schemat ukazujący zjawisko stresu oksydacyjnego został przedstawiony na rycinie 1 (Ryc. 1).



Ryc. 1. Stres oksydacyjny jako stan braku równowagi pomiędzy wytwarzaniem RFT a procesami antyoksydacyjnymi. Opracowanie własne.

### 1.2.1. WZMOŻONA SYNTEZA RFT W PRZEWLEKŁEJ CHOROBY NEREK

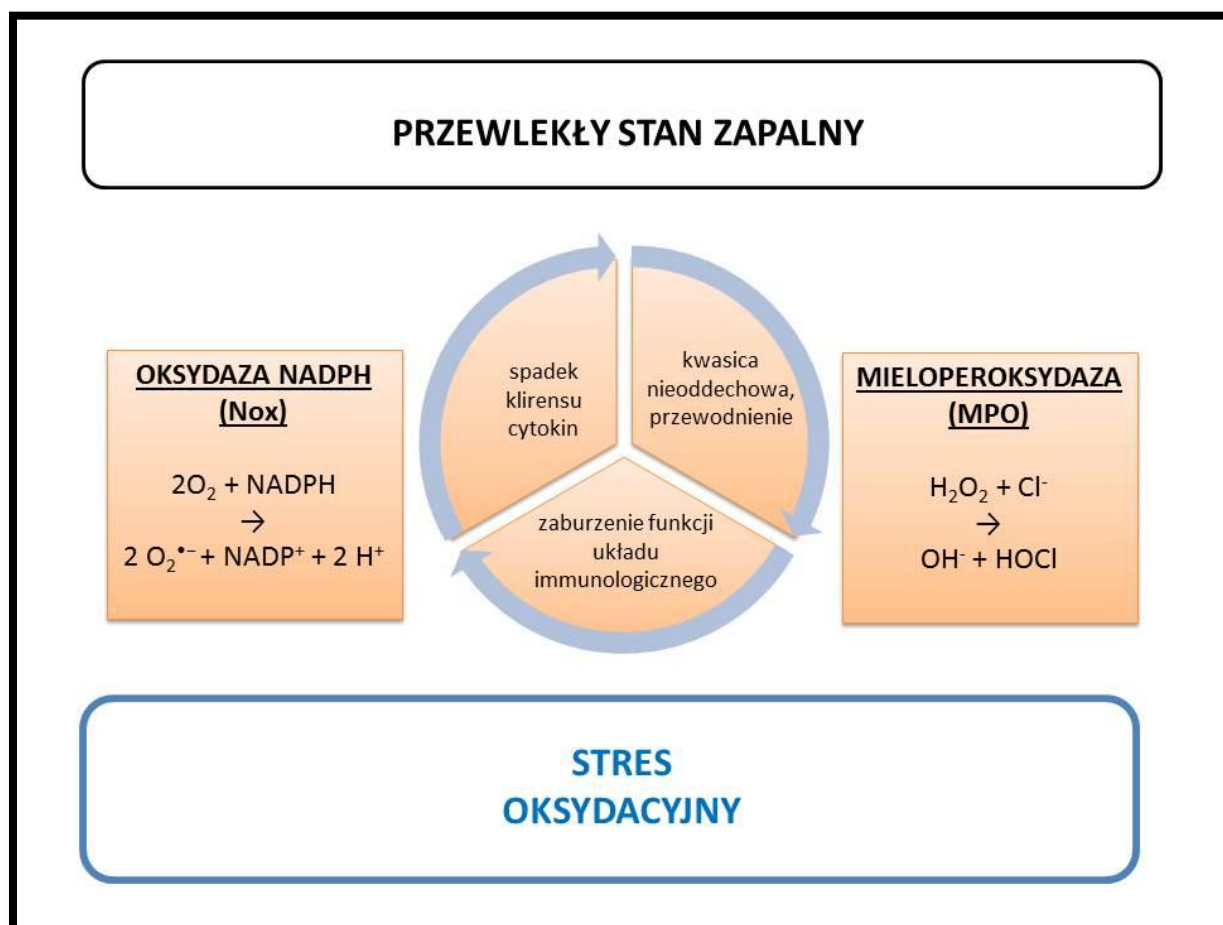
Reaktywne formy tlenu stanowią heterogenną grupę cząsteczek, do której zalicza się: wolne rodniki z niesparowanym elektronem w atomie tlenu, np. anionorodnik ponadtlenkowy (ang. *superoxide radical*,  $O_2^{\bullet -}$ ) oraz rodnik hydroksylovyy (ang. *hydroxyl radical*,  $HO^{\bullet}$ ); cząsteczki nieposiadające niesparowanego elektronu, ale charakteryzujące się znacznym potencjałem utleniającym, jak np. nadtlenuk wodoru (ang. *hydrogen peroxide*,  $H_2O_2$ ) czy tlen singletowy oraz związki tlenu z innymi pierwiastkami, jak np. nadtlenuoazotyn (ang. *peroxynitrite*,  $ONOO^-$ ) i kwas podchlorawy (ang. *hypochlorous acid*,  $HOCl$ ) [6-7].

Przyczyny wzmożonej aktywności wolnorodnikowej w przebiegu PChN są wieloczynnikowe. Kluczowym enzymem związanym z produkcją RFT jest oksydaza NADPH (ang. *NADPH oxidase*, Nox), występująca w czterech izoformach (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4) [6-9]. W PChN szczególną rolę przypisuje się zlokalizowanej w nerce izoformie 4 Nox (Nox4), której wzmożona aktywność skutkuje nasileniem syntezy  $O_2^{\bullet -}$  [18]. Spontaniczna lub enzymatyczna dysmutacja  $O_2^{\bullet -}$  prowadzi do syntezy  $H_2O_2$ , który charakteryzuje się niższym potencjałem utleniającym, ale łatwo przenika przez błony komórkowe i umożliwia rozprzestnienie się stresu oksydacyjnego w organizmie.  $H_2O_2$  stanowi substrat dla mieloperoksydazy (ang. *myeloperoxidase*, MPO) – enzymu odpowiedzialnego za utlenianie jionów chlorkowych ( $Cl^-$ ) do kwasu podchlorawego ( $HOCl$ ), który może modyfikować kolejne cząsteczki [6-9].

PChN promuje powstanie RFT także w wyniku rozwoju przewlekłego stan zapalny, który wynika z nasilenia reakcji wybuchu tlenowego w pobudzonych komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) i komórkach wielojądrzastych (ang. *polymorphonuclear leukocytes*, PMN). U pacjentów z PChN stwierdza się wysoką aktywność Nox2, kluczowego enzymu wybuchu tlenowego [10-12]. Nie zaobserwowano natomiast podobnej prawidłowości w przypadku MPO – u pacjentów z PChN stwierdzono odwrotną zależność pomiędzy stężeniem MPO a stężeniami mocznika i kreatyniny lub też prawidłowe stężenia MPO. Z drugiej strony, opisywano wzrost stężenia MPO u chorych leczonych nerkozastępczo, a na modelach zwierzęcych udowodniono, że niedobór MPO opóźnia progresję PChN [13].

Rozwój przewlekłego stanu zapalny w PChN związany jest z hipercytokinemią oraz kumulacją toksyn mocznicowych w wyniku spadku klirensu nerkowego. Wzrost obciążenia wstępnego w układzie krążenia oraz kwasica nieoddechowa i nieprawidłowe funkcjonowanie układu immunologicznego stymulują wydzielanie cytokin prozapalnych [14]. Na rycinie 2

(Ryc. 2) przedstawiono powiązania pomiędzy przewlekłym stanem zapalnym i stresem oksydacyjnym w PChN.



Ryc. 2. Przewlekły stan zapalny i stres oksydacyjny w PChN. Opracowano na podstawie [20, 22].

Kolejnym źródłem RFT u chorych z PChN są mitochondria, gdzie wyciek elektronów z łańcucha oddechowego powoduje, że zamiast pełnej redukcji tlenu dochodzi do syntezy  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . U chorych w SNN stwierdzono spadek aktywności oksydazy cytochromowej w PBMC [15]. Z kolei u pacjentów leczonych nerkozastępczo zaobserwowano szereg nieprawidłowości dotyczących genów białek związanych z biogenezą i działaniem mitochondriów [15-16]. Wzmocniona produkcja RFT powoduje głębokie zahamowanie syntezy adenosynotrifosforanu (ang. *adenosine trisphosphate*, ATP) co prowadzi do hipertrofii pozostałych składników łańcucha oddechowego i dalszego nasilenia syntezy RFT [16].

## 1.2.2. SPADEK AKTYWNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ W PRZEWLEKLEJ CHOROBY NEREK

Patogeneza PChN związana jest z niedostateczną sprawnością systemów antyoksydacyjnych. Jednym z priorytetowych enzymów odpowiedzialnych za ochronę przed stresem oksydacyjnym jest dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*, SOD), która przeprowadza dysmutację  $O_2^-$  do  $H_2O_2$ . Z kolei reakcję dysmutacji  $H_2O_2$  do  $H_2O$  katalizuje katalaza (ang. *catalase*, CAT). Innym ważną rodziną enzymów antyoksydacyjnych jest rodzina peroksydazy glutationowej (ang. *glutathione peroxidase*, GPx), która odpowiada za redukcję  $H_2O_2$  i nadtlenków organicznych [7-8].

Wraz z obniżaniem GFR obserwuje się spadek aktywności SOD i CAT [10] korelujący ze stopniem zaawansowania PChN [17]. W przypadku GPx zanotowano wzrost aktywności izoformy zlokalizowanej w erytrocytach (GPx1), podczas gdy aktywność osoczowej postaci enzymu (GPx3) obniżała się wraz ze spadkiem GFR. Rozbieżność tę tłumaczy fakt, że głównym źródłem wydzielniczej GPx3 są komórki nabłonka kanalików proksymalnych, które ulegają uszkodzeniu we wczesnych stadiach PChN [7, 18].

Jedną z przyczyn deficytu aktywności antyoksydacyjnej w PChN mogą być nieprawidłowości dotyczące gospodarki pierwiastków śladowych, takich jak cynk [19-21] i selen [21-23], które są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania enzymów antyoksydacyjnych. Z drugiej strony, część badaczy nie wykazuje znaczących różnic w stężeniu tych pierwiastków pomiędzy osobami zdrowymi a pacjentami z PChN [24-26].

Oprócz enzymów antyoksydacyjnych w ochronie ustroju przed działaniem RFT biorą udział nieenzymatyczne antyoksydanty. Antyoksydanty hydrofobowe ( tokoferol- $\alpha$ , cholekalcyferol, bilirubina, biliwerdyna) chronią błony komórkowe i lipoproteiny. Natomiast hydrofilowe antyoksydanty, takie jak kwas askorbinowy, kwas moczowy, cysteina i glutation, zlokalizowane są w cytozolu lub rozpuszczone w osoczu [27].

U pacjentów z PChN niedobór niskocząsteczkowych antyoksydantów może rozwinąć się w wyniku: zaburzeń wchłaniania spowodowanych obrzękiem błony śluzowej przewodu pokarmowego, zaburzeń łaknienia wynikających z powikłań hormonalnych PChN oraz w przebiegu ograniczeń dietetycznych stosowanych u chorych nefrologicznych [28-30].

Szczególne rolę w patogenezie PChN odgrywa witamina D, której aktywność antyoksydacyjna przewyższa aktywność innych związków hydrofobowych [31]. Istnieje szereg doniesień dokumentujących wpływ aktywnego metabolitu witaminy D, kalcytriolu, na wzrost aktywności SOD [32], zwiększenie ekspresji genu reduktazy glutationu [32] i wpływ

na syntezę RFT w komórce poprzez wiązanie się z jądrowym receptorem witaminy D (ang. *vitamin D receptor*, VDR) [33]. Zaburzenia metabolizmu witaminy D wiążą się z szeregiem innych nieprawidłowości gospodarki wapniowo-fosforanowej, takich jak nieprawidłowe stężenia parathormonu (ang. *parathormon*, PTH), białka Klotho i czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor*, FGF23) [34-35].

### **1.2.3. METODY LECZENIA NERKOZASTĘPCZEGO A STRES OKSYDACYJNY**

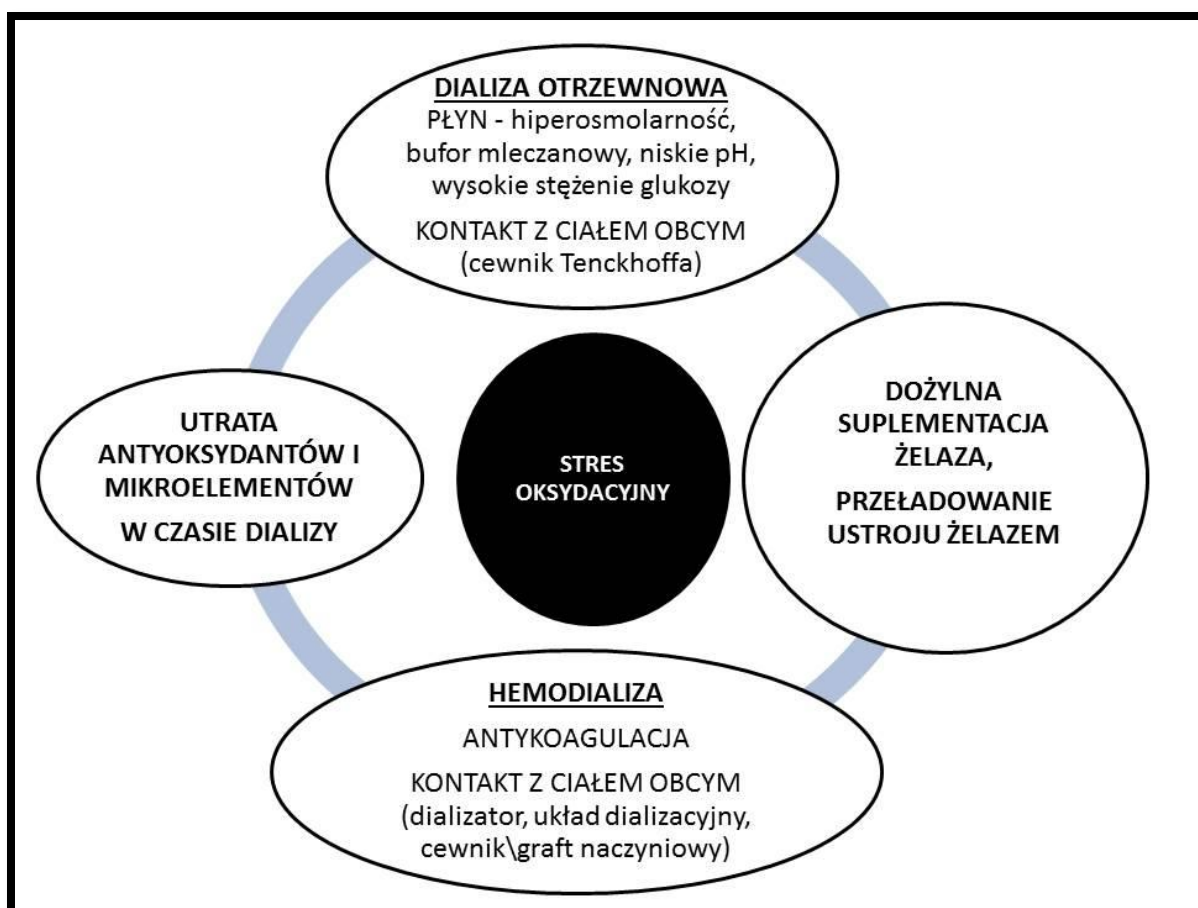
Nasilenie stresu oksydacyjnego wynika nie tylko z patomechanizmu PChN, ale także z metod leczenia nerkozastępczego, które zaburzają równowagę redox ustroju.

W przypadku dializ otrzewnowych komórki mezotelium w hiperglikemicznym środowisku są źródłem  $H_2O_2$  i  $O_2^{\cdot-}$  [36]. Niskie pH oraz wysoka osmolalność wpływają na PBMC i PMN, co nasila produkcję RFT [37-39].

Z kolei pojedyncza sesja hemodializy powoduje wzrost stężenia wykładników stresu oksydacyjnego, którego źródłem są komórki PMN [40]. Kontakt krwi z powierzchnią niepokrytą prawidłowym śródbłonkiem skutkuje pobudzeniem kaskady krzepnięcia, układu kalikreina-kinonogen i układu dopełniacza oraz aktywację PMN i sekrecję cytokin prozapalnych [40-41]. Dodatkowe źródło stresu oksydacyjnego stanowi stosowanie heparyny, co powoduje wzrost aktywności MPO [42].

Każda z technik leczenia nerkozastępczego może skutkować utratą rozpuszczalnych w wodzie związków niskocząsteczkowych, do których zalicza się duża część antyoksydantów i mikroelementów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania enzymów antyoksydacyjnych [43]. Jednak głównym problemem wielu pacjentów leczonych nerkozastępczo jest wysokie stężenie żelaza, które świadczy o przeładowaniu organizmu tym pierwiastkiem [44]. Znaczenie metod leczenia nerkozastępczego w powstawaniu stresu oksydacyjnego zostało przedstawione na rycinie 3 (Ryc. 3).



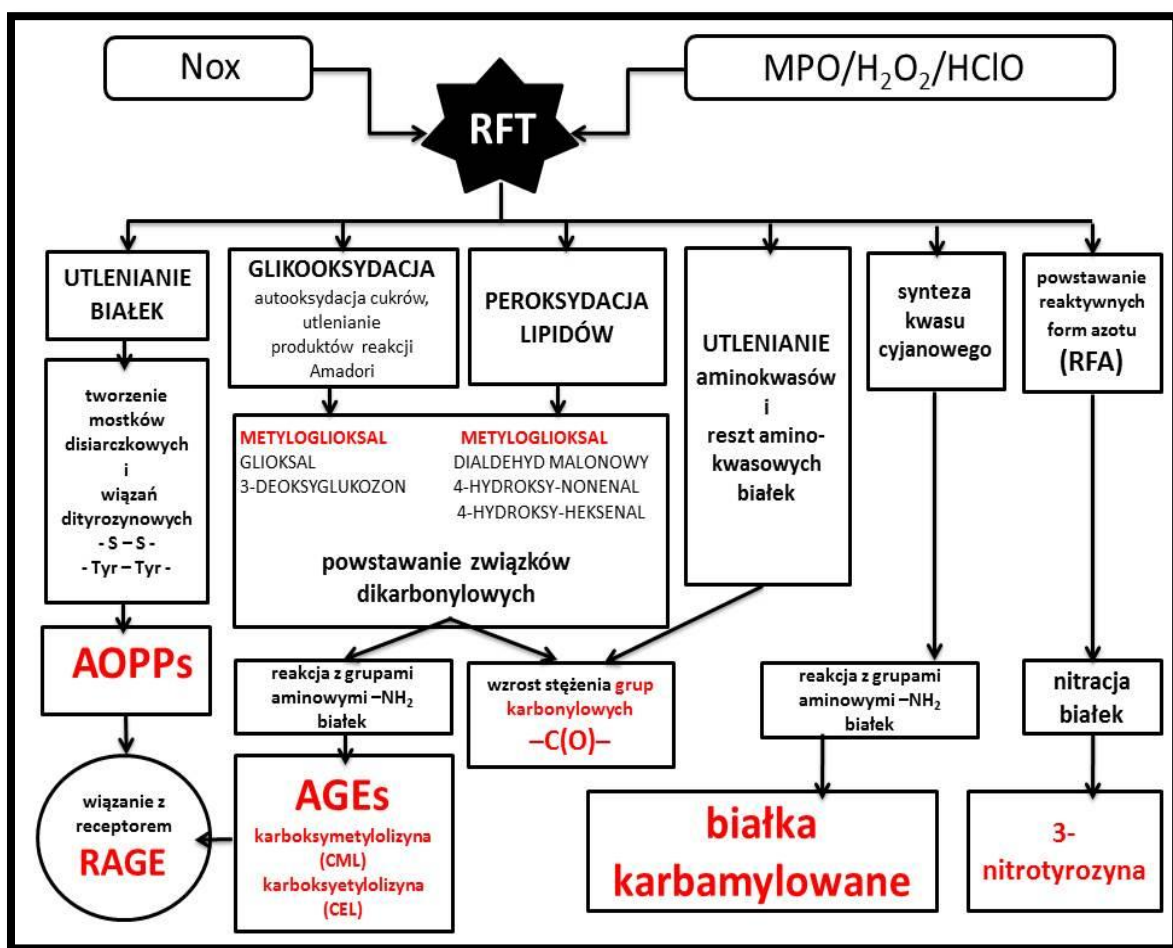


Ryc. 3. Znaczenie metody leczenia nerkozastępczego w powstawaniu stresu oksydacyjnego. Opracowanie własne.

### 1.3. MODYFIKACJE BIAŁEK W PRZEWLEKŁEJ CHOROBIE NEREK

W warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do utleniania białek, co wiąże się z modyfikacją potranslacyjną reszt aminokwasowych łańcucha polipeptydowego. Modyfikacje białek doprowadzają do zmiany struktury cząsteczki, utraty aktywności enzymatycznej oraz zdolności do rozpoznawania i łączenia się z ligandem. W efekcie w komórce obserwuje się zakłócenie szlaków sygnałowych, nieprawidłowe działania enzymów, białek regulatorowych i czynników transkrypcyjnych, co może doprowadzić do śmierci komórki. Modyfikacja białek macierzy pozakomórkowej i białek osocza zmienia ich właściwości fizykochemiczne, co skutkuje zakłóceniem transportu hormonów, witamin i mikroelementów, prowadzi do dyslipidemii, zaburzeń metabolicznych i nieprawidłowości gospodarki wodno-elektrolitowej. W ten sposób stres oksydacyjny doprowadza – poprzez modyfikację białek – do zaburzeń ogólnoustrojowej homeostazy [6-7].

Modyfikacja białek w warunkach stresu oksydacyjnego obejmuje szerokie spektrum zmian, od tworzenia wiązań dityrozynowych i mostków disiarczkowych, poprzez reakcje glikooksydacji i karbonylacji oraz nitracji i S-nitrozylacji, na karbamyłacji kończąc. Typy oksydacyjnych modyfikacji białek, do których dochodzi w PChN, przedstawiono na rycinie 4 (Ryc. 4). Badanie kumulacji zmodyfikowanych białek nie tylko pozwala ocenić zaburzenie równowagi redox w ustroju, ale równocześnie umożliwia analizę wpływu modyfikacji białek na patogenezę PChN. Związki powstające w wyniku działania RFT mogą przyczynić się do rozwoju powikłań takich jak miażdżyca, dyslipidemia, osteodystrofia nerkowa oraz niedokrwistość i amyloidoza dializacyjna.



Ryc. 4. Oksydacyjne modyfikacje białek. Opracowanie własne.

Kolorem czerwonym zaznaczono te, które były przedmiotem oceny w rozprawie doktorskiej.

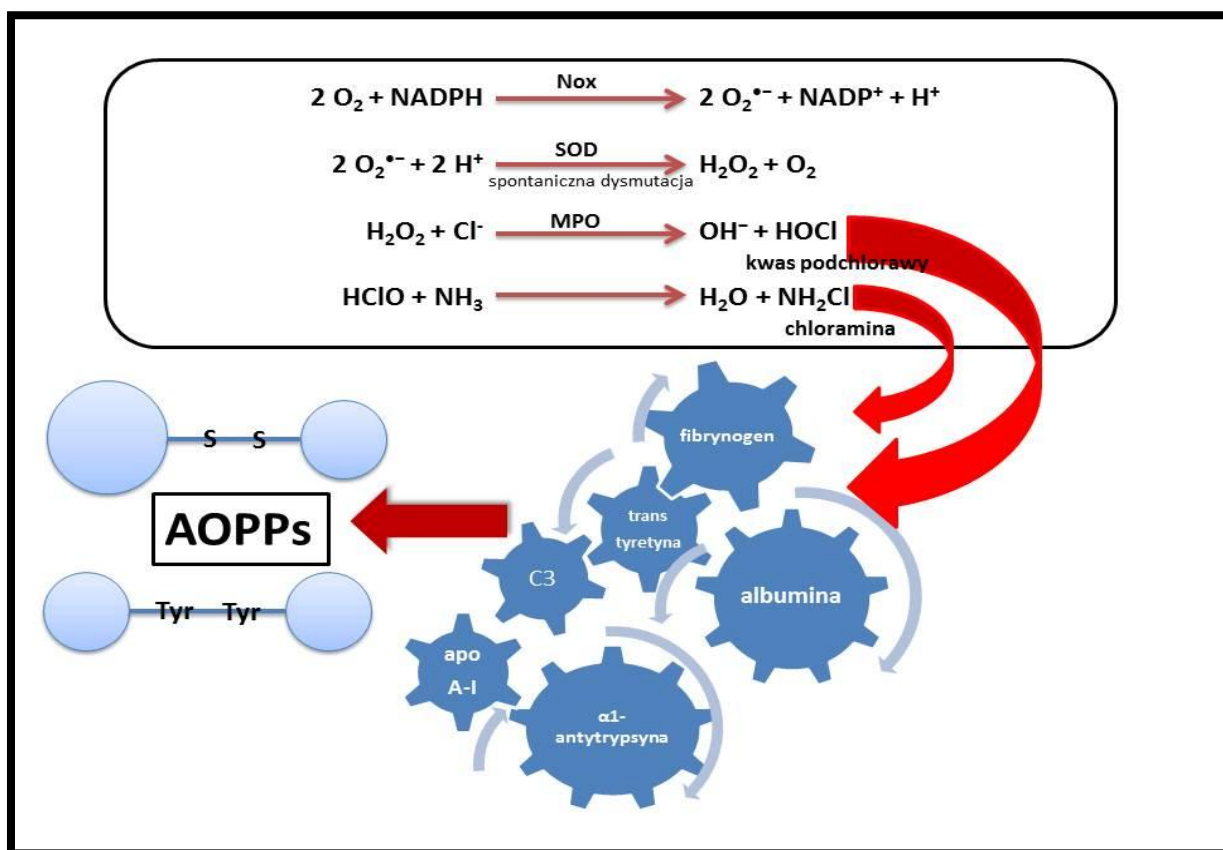
### 1.3.1. ZAAWANSOWANE PRODUKTY UTLENIANIA BIAŁEK

Pod wpływem działania RFT dochodzi do utlenienia białek osocza, a produkty tych reakcji zostały zidentyfikowane w osoczu pacjentów nefrologicznych przy pomocy metody opracowanej przez Witko-Sarsat et al. [45-47]. W powstawaniu AOPPs kluczową rolę odgrywa Nox i MPO, które doprowadzają do syntezy HOCl. Może on wchodzić w reakcję z amoniakiem lub grupami aminowymi reszt aminokwasowych, co skutkuje pojawieniem się chloraminy, kolejnego wysoce reaktywnego związku, który odpowiedzialny jest za modyfikacje białek. Zarówno HOCl, jak i chloramina, uszkadzają białka osocza, zmieniając ich skład i strukturę [45-47]. W 1996 r., wykorzystując metodę opracowaną przez Witko-Sarsat et al., wykazano wysokie stężenia AOPPs w osoczu pacjentów z PChN [45]. Ponadto stwierdzono u nich obecność w osoczu dwóch szczytów absorbancji, przy długości fali 280 i 340 nm, co związane było z występowaniem białek o masie cząsteczkowej, odpowiednio, 670 kDa i 70 kDa. Grupy te, określane jako wielkocząsteczkowe AOPPs (ang. *high molecular weight advanced oxidation protein products*, HMW-AOPPs) oraz małowcząsteczkowe AOPPs (ang. *low molecular weight advanced oxidation protein products*, LMW-AOPPs), nie pojawiały się w porównywalnych stężeniach u osób zdrowych. Dominującym składnikiem obu frakcji okazała się albumina, która w HMW-AOPPs tworzyła wielkocząsteczkowe agregaty, natomiast w LMW-AOPPs występowała w postaci utlenionego monomeru albo też produktów degradacji utlenionej albuminy. Polimeryzacja albuminy była możliwa dzięki tworzeniu mostków disiarczkowych oraz wiązań krzyżowych dityrozyny. Analiza składu aminokwasowego dowiodła, że pod wpływem RFT dochodzi głównie do modyfikacji reszt tyrozyny, tryptofanu, aminokwasów zasadowych (lizyna, arginina) oraz aminokwasów zawierających siarkę (metionina, cysteina). Stwierdzono również istotny wzrost zawartości grup karbonylowych oraz zmiany w strukturze przestrzennej, takie jak zmniejszenie liczby  $\alpha$ -helis [45-47].

Albumina – główne białko osocza ulegające modyfikacjom w warunkach stresu oksydacyjnego – fizjologicznie występuje w postaci zredukowanej z wolną grupą tiolową w pozycji Cys-34. Stres oksydacyjny doprowadza do przewagi formy utlenionej albuminy, w której wysoce reaktywna grupa tiolowa Cys-34 tworzy wiązanie disiarczkowe z glutationem (HNA-(Glut)) lub cysteiną (HNA-(Cys)). Grupa tiolowa (-SH) może też ulec utlenieniu do grupy sulfenowej (-SOH), sulfinowej (-SO<sub>2</sub>H) lub sulfonowej (-SO<sub>3</sub>H), co daje inną postać utlenionej albuminy, HNA(oxi). Dalszy atak RFT powoduje kolejne modyfikacje, przy czym najbardziej podatne są reszty aminokwasowe aminokwasów zasadowych, aromatycznych i

zawierających atom siarki (cysteina, tyrozyna, metionina, lizyna, arginina, histydyna, prolina i tryptofan). Oprócz utlenienia wolnej grupy tiolowej Cys-34, najczęściej występujące oksydacyjne modyfikacje albuminy obejmują modyfikację N-końca albuminy i utlenianie Trp-214. Grupy karbonylowe powstają w wyniku utlenienia grup tiolowych. Późnym etapem modyfikacji jest tworzenie wiązań krzyżowych, co skutkuje formowaniem AOPPs [48-49].

Utlenująca albumina stanowi zasadniczy składnik AOPPs, ale zawierają one także pochodne innych białek osocza, które uległy działaniu RFT. Tworzenie nadtlenu białek prowadzi do modyfikacji reszt aminokwasowych, rozrywania łańcuchów polipeptydowych, tworzenia dimerów i agregatów zmodyfikowanych białek. Takim przemianom mogą podlegać apolipoproteiny (apolipoproteina A-I), białka transportowe (transtyretyna, haptoglobina), enzymy ( $\alpha$ 1-antytrypsyna) i składowe dopełniacza (C3) [50]. Część badaczy postuluje strategiczną rolę fibrynogenu w formowaniu AOPPs. Udowodniono, że łańcuchy  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  tego białka stanowią znaczący składnik HMW-AOPPs, a w obecności HOCl tworzą wiązania krzyżowe, związane z tworzeniem dityrozyny [51-52]. Schemat powstawania AOPPs przedstawiono na rycinie 5 (Ryc. 5).



Ryc. 5. Powstawanie zaawansowanych produktów utlenienia białek (AOPPs). Opracowanie własne.

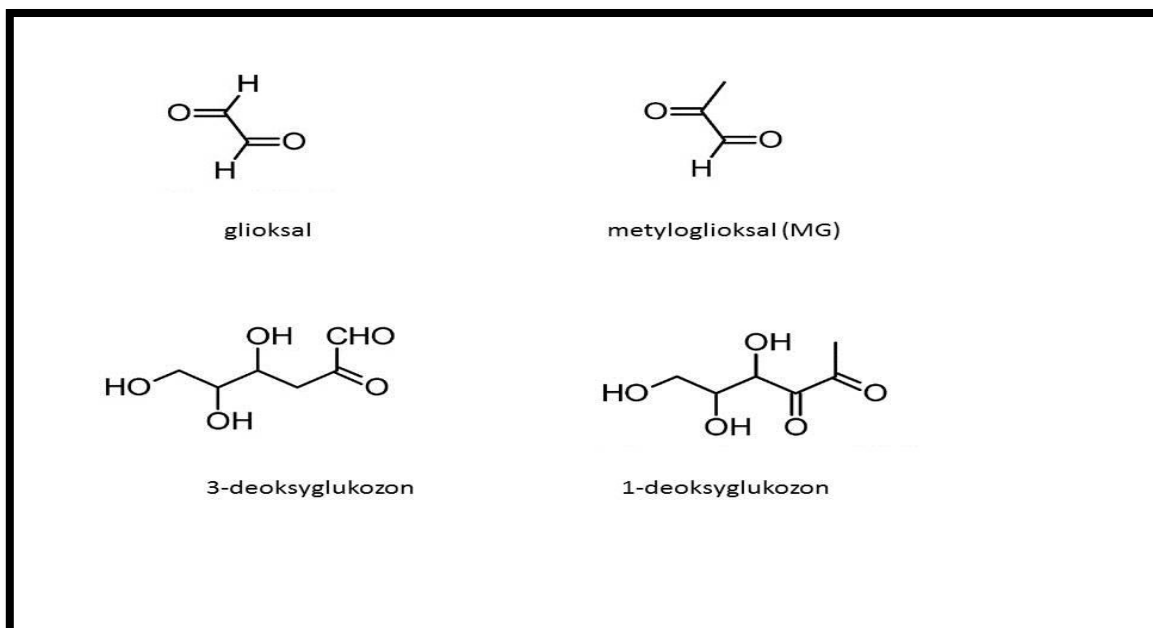
Fizjologicznie, AOPPs występują także w osoczu u osób zdrowych, a ich stężenie wzrasta wraz z wiekiem i masą ciała. Za ich eliminację z krążenia odpowiada szereg mechanizmów doprowadzających do degradacji w lizosomach i proteasomach. AOPPs są rozpoznawane przez multiligandowe receptory dla zaawansowanych produktów glikacji (ang. *receptor for advanced glycation end products*, RAGE), obecne na powierzchni komórek śródbłonna, mięśni gładkich, fibroblastów, monocytów/makrofagów i hepatocytów. W warunkach stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego dochodzi do wzmożonej ekspresji RAGE. Interakcja RAGE z AOPPs powoduje rekrutację czynnika jądrowego  $\kappa$ B zidentyfikowanego w limfocytach B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF- $\kappa$ B) z połączenia z białkiem inhibitorowym I $\kappa$ B, co umożliwia ekspresję genów cytokin prozapalnych (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i  $\beta$ ), chemokin (białko zapalne makrofagów (ang. *macrophage inflammatory protein*, MIP), adhezyn (naczyniowa cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (ang. *vascular adhesion molecule 1*, VCAM-1), cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (ang. *intracellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) i enzymów (cyklooksygenaza-2 (ang. *cyclooxygenase 2*, COX-2), fosfolipaza A2). Nasilenie procesu zapalnego związane z pobudzeniem receptora RAGE jest silniej wyrażone w przypadku jego oddziaływania z AOPPs, niż przy wiązaniu z AGEs, co przyczynia się do rozwoju powikłań PChN [52-53].

AOPPs bezpośrednio przyczyniają się do uszkodzenia nerek, co, w mechanizmie dodatniego sprzężenia zwrotnego, przyspiesza postęp choroby. Wykazano, że receptor RAGE obecny na podocytach, po połączeniu z AOPPs, doprowadza – poprzez stymulację szlaku kinazy białkowej C (ang. *protein kinase C*, PKC) – do wzmożonej aktywności Nox i nasilenia wewnątrzkomórkowej syntezy O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Kolejnym efektem pobudzenia receptora RAGE na podocytach jest aktywacja szlaku p53-Bcl-2/Bax, co skutkuje zależnym do kaspazy-3 wyciekaniem cytochromu c z mitochondriów i apoptozą komórki [53]. Z kolei w kanalikach nerkowych AOPPs oddziałują na komórki nabłonka dzięki wiązaniu się z receptorami SR klasy B, np. CD36 [54]. Udowodniono, zarówno *in vitro*, jak *in vivo*, że AOPPs w komórkach nabłonka kanalików nerkowych powodują pobudzenie wewnątrznerkowego układu renina-angiotensyna-aldosteron (ang. *renine-angiotensin-aldosterone*, RAA) poprzez stymulację receptora CD36, szlak kinazy PKC, aktywację Nox i jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B [55]. AOPPs stymulują też wzmożone wydzielanie transformującego czynnika wzrostu beta (ang. *transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ), co promuje transformację fenotypową w kierunku fibroblastów. Równolegle w śródmiąszu obserwuje się nasiloną syntezę kolagenu i fibronektyny, wynikającą z pobudzającego działania AOPPs na aktywność

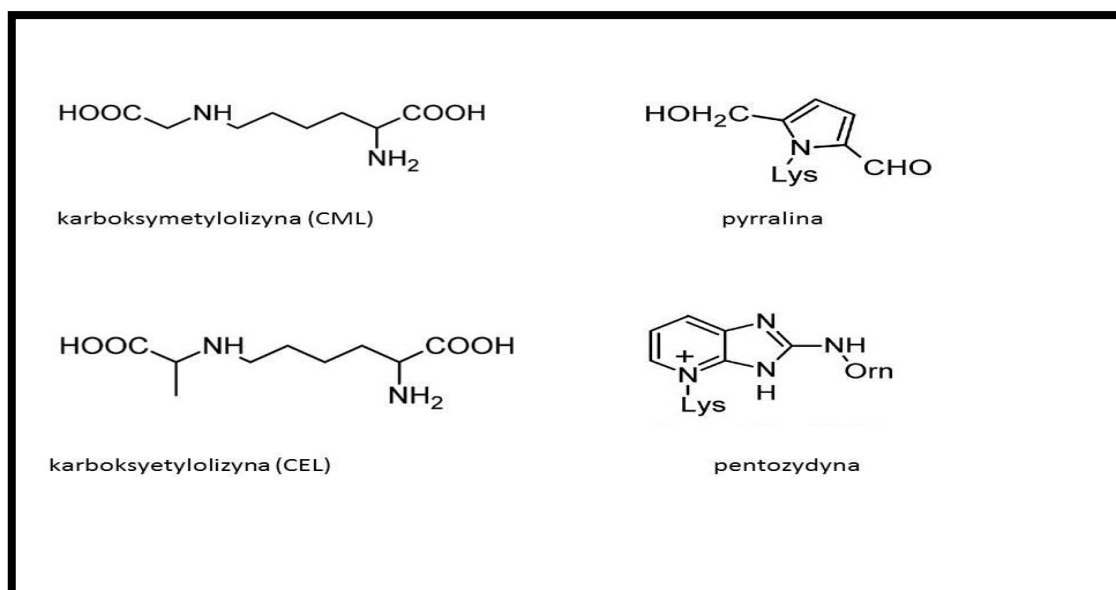
Nox [56]. Tak więc końcowym efektem kumulacji AOPPs u pacjentów nefrologicznych jest zwłóknienie nerek [57].

### **1.3.2. METYLOGLIOKSAL, KARBOKSYMETYLOLIZYNA, KARBOKSYETYLOLIZYNA, ZAAWANSOWANE PRODUKTY GLIKACJI**

Glikacja jest nieenzymatycznym, wieloetapowym procesem, w którym grupy karbonyłowe cukrów reagują z grupami aminowymi reszt aminokwasowych białek, kwasów nukleinowych i fosfolipidów. In vivo można wyróżnić kilka etapów glikacji. Na początku reakcja grupy karbonyłowej cząsteczki cukru z grupą aminową białka powoduje powstanie aldiminy (zasady Schiffa), co przebiega stosunkowo szybko, tak więc stan równowagi zostaje osiągnięty w ciągu kilku godzin. W ciągu kolejnych kilku tygodni, w wyniku reakcji Amadori, aldimina ulega przekształceniu w bardziej trwały związek – ketoaminę. Reakcja Amadori może zachodzić w fizjologicznym pH, ale promuje ją pH zasadowe i obecność anionów fosforanowych. Produkty reakcji Amadori (ang. *Amadori rearrangement products*, ARP) stanowią tzw. wczesne produkty glikacji. W niskim pH enolizacja prowadzi do przekształcenia ARP w związki 1,2-dikarbonyłowe, podczas gdy wyższe pH sprzyja enolizacji, finalnie dającej związki 2,3-dikarbonyłowe. Dehydratacja związków 2,3-dikarbonyłowych prowadzi do syntezy związków  $\alpha$ -dikarbonyłowych (glioksal, MG, 3-deoksyglukozon). Mogą one powstawać także bezpośrednio z ARP w wyniku utlenienia i defragmentacji, które katalizowane są w dużej mierze przez jony metali przejściowych. ARP i związki dikarbonyłowe reaktywnością przewyższają wyjściowe cukry, dlatego też łatwo uszkadzają kolejne cząsteczki białek, tworząc AGEs [58-59]. Początkowe etapy, związane z powstawaniem zasad Schiffa i ARP są odwracalne, natomiast kolejne reakcje prowadzą do trwałych modyfikacji. Należy pamiętać, że zarówno związki dikarbonyłowe, jak i AGEs dostarczane są również do organizmu z pożywieniem. Znajdują się w pokarmach poddanych fermentacji, pieczeniu lub smażeniu, a także w napojach i pokarmach o dużej zawartości cukrów. W środowisku źródłem związków dikarbonyłowych jest również dym papierosowy i spaliny pojazdów [60]. Wzory strukturalne wybranych związków dikarbonyłowych oraz AGEs przedstawiono na rycinach 6 i 7 (Ryc. 6, Ryc. 7).



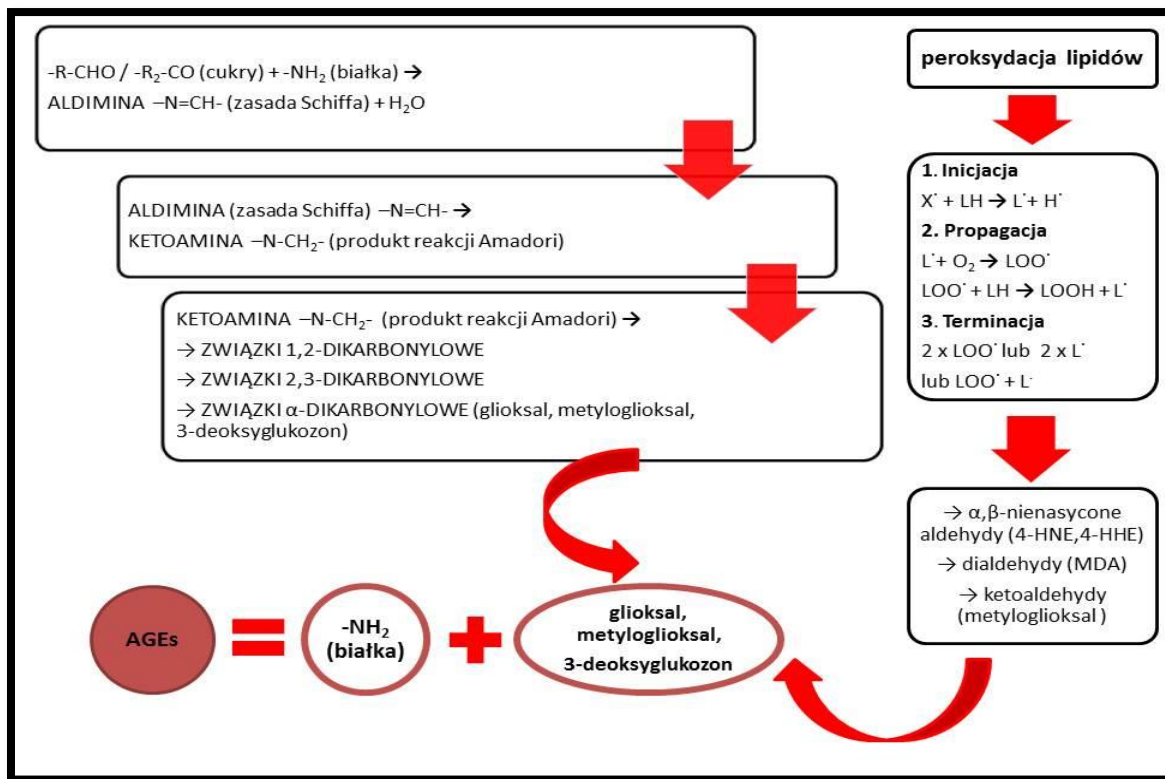
Ryc. 6. Wzory strukturalne związków dikarbonylowych. Opracowano na podstawie [172].



Ryc. 7. Wzory strukturalne AGEs. Opracowano na podstawie [172].

Stres oksydacyjny, rozwijający się w PChN, ma swoje źródło nie tylko w nieprawidłowym metabolizmie cukrów. Lipooksydacja, na równi z glikacją, przyczynia się do formowania związków dikarbonylowych [61-62]. U pacjentów z PChN lipooksydacja nie zależy od podwyższonego stężenia trójglicerydów, podobnie jak glikacja nie wynika z hiperglikemii [61]. Stwierdza się natomiast korelację produktów peroksydacji lipidów, takich jak dialdehyd malonowy-lizyna, z CML (Ryc. 8) zaliczaną do AGEs [63]. Peroksydacja

lipidów jest samonapędzającym się procesem, który zapoczątkowują RFT, w tym wysoce reaktywny HO<sup>•</sup>. Składa się ona z trzech faz: inicjacji, elongacji i terminacji (Ryc. 8). Na końcowym etapie powstają trzy grupy związków karbonylowych: α,β-nienasycone aldehydy (4-hydroksy-2-nonenal (ang. *4-hydroxy-2-nonenal*, 4-HNE), 4-hydroksy-2-heksenal (ang. *4-hydroxy-2-hexenal*, 4-HHE); dialdehydy (dialdehyd malonowy ang. *malondialdehyde*, MDA) oraz ketoaldehydy (MG). Wszystkie cechują się znaczną reaktywnością, a ich reakcje z grupami aminowymi białek prowadzą do tworzenia zaawansowanych produktów lipooksydacji (ang. *advanced lipoxidation end products*, ALEs). Jest to również niejednorodna grupa jak AGEs, obejmująca m.in. cykliczne karbinoloaminy i hemiacetale. Peroksydacja dotyczy nie tylko wolnych kwasów tłuszczowych, ale i fosfolipidów. Powstające wówczas produkty, choć syntetyzowane są w wyniku tego samego typu reakcji, mają jednak odmienne właściwości fizykochemiczne (np. lipofilność), różną dystrybucję wewnątrzkomórkową i wchodzą w reakcje z innymi typami białkami [60-61].



Ryc. 8. Powstawanie zaawansowanych produktów glikacji (AGEs). Opracowanie własne.

Usuwanie AGEs z krążenia związane jest z ich interakcją z kilkoma typami receptorów. Zalicza się do nich: receptory zmiatające klasy A (SR-A1) i klasy B (CD36),



receptory AGE (AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3) oraz multiligandowy receptor RAGE. W ustroju istnieje szereg układów enzymatycznych odpowiedzialnych za rozkład ARP, związków dikarbonylowych i AGEs. Bardzo ważną rolę pełni cytoplazmatyczny układ glioksalaz (GLO1 i GLO2), którego funkcjonowanie wymaga obecności glutationu. Niedobór tego antyoksydanta lub spadek aktywności reduktazy glutationowej skutkuje zahamowaniem rozkładu MG (Ryc. 9) do mleczanu. Z kolei NADPH-zależna reduktaza aldolowa, kolejny enzym eliminujący glioksal i MG, może funkcjonować przy niedoborze glutationu – wówczas MG jest przekształcany do hydroksyacetonu, podczas gdy obecność glutationu warunkuje rozkład do aldehydu mlekowego. Możliwe jest również przekształcenie MG do pirogronianu w wyniku działania dehydrogenazy aldehydowej, ale znaczenie tego enzymu w metabolizmie związków dikarbonylowych *in vivo* nie zostało jednoznacznie wykazane [64]. AGEs połączone z białkami, jako związki wielkocząsteczkowe, ulegają degradacji w proteasomach. W wyniku proteolizy mogą powstawać zmodyfikowane aminokwasy, które przedostają się do krążenia. Część AGEs wykazuje znaczną oporność na działanie proteaz z powodu obecności wiązań krzyżowych i tworzenia agregatów. Prowadzi to do kumulacji w ustroju AGEs połączonych z białkami. Zmodyfikowane aminokwasy, podobnie jak związki dikarbonylowe, jeśli znajdują się w osoczu, są filtrowane przez kłębuszki nerkowe i w większości zostają wydalone z moczem. Jedynie niewielka część AGEs podlega reabsorpcji i degradacji na poziomie kanalikula proksymalnego [58, 65]. Schemat powstawania AGEs przedstawiono na rycinie 8 (Ryc. 8).

Reaktywne związki dikarbonylowe są nie tylko pośrednim ogniwem w procesie syntezy AGEs i ALEs. Mają one także bezpośredni wpływ na postęp PChN i jej powikłań. Zaobserwowano, że MG nasila oksydacyjne modyfikacje białek, stymulując reakcję wybuchu tlenowego w PBMC poprzez aktywację kinazy p38 z grupy MAPK [66]. Opisano także wpływ MG *in vitro* na komórki mięśni gładkich naczyń, komórki wysp beta trzustki i neurony kory ośrodkowego układu nerwowego oraz na nabłonek kanalików nerkowych, gdzie MG powodował rozprzęgnięcie mitochondrialnego łańcucha oddechowego z uwolnieniem RFT [67].

Podobnie jak MG, AGEs również są zaangażowane w patogenezę PChN. Wewnątrzkomórkowo AGEs nasilają zaburzenia równowagi redox zarówno przez stymulowanie Nox [68], jak i poprzez wpływ na mitochondrialną produkcję RFT [69]. Kolagen połączony z AGEs jest mniej podatny na działanie enzymów hydrolitycznych, a elastyna po połączeniu z AGEs zmienia swoje właściwości fizykochemiczne. W efekcie obserwuje się zwiększoną sztywność ściany naczyń oraz zwłóknienie kłębuszków [7-71].

AGEs związane są również z powikłaniami leczenia nerkozastępczego. Formowanie GDP i AGEs w płynach wysokoglukozowych powoduje transformację fenotypową komórek mezotelium w kierunku fibroblastów i utratę funkcji otrzewnej jako błony dializacyjnej [72]. Z kolei u pacjentów hemodializowanych stwierdzono, że stres karbonylowy koreluje z rozwojem amyloidozy dializacyjnej, w której złogi amyloidu zawierają, oprócz  $\beta_2$ -mikroglobuliny, także AGEs [73].

### 1.3.3. GRUPY KARBONYLOWE BIAŁEK

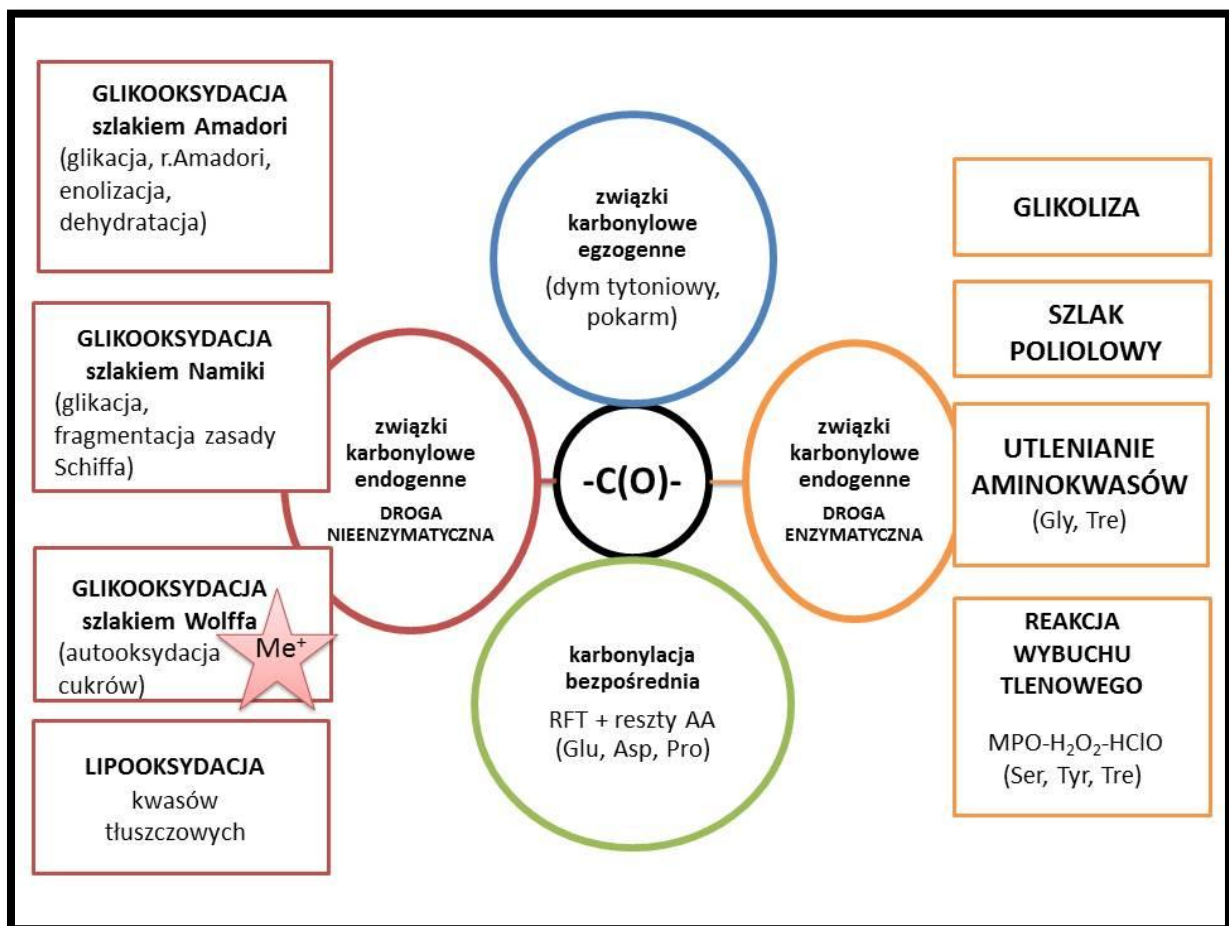
Koncepcję stresu karbonylowego wysunął Miyata et al., definiując go jako wynik nasilonego utleniania lipidów i cukrów lub nieadekwatnej inaktywacji reaktywnych związków karbonylowych, pochodzących z oksydacyjnych i nieoksydacyjnych przemian lipidów i cukrów [63]. Fizjologicznie grupy karbonylowe występują w ustroju w niewielkich stężeniach, w osoczu ich stężenie kształtuje się na poziomie 0,4 – 1,0 nmol/mg białka. W specyficznych warunkach dochodzi do wzrostu zawartości grup karbonylowych z 1/3000 reszt aminokwasowych do 2-8/3000 reszt aminokwasowych [74].

Związki odpowiedzialne za tworzenie grup karbonylowych w obrębie białek mogą mieć postać  $\alpha,\beta$ -nienasyconych aldehydów (4-HNE i 4-HHE), dialdehydów (MDA) oraz ketoaldehydów (MG, 4-okso-2-nonenal (ang. *4-oxo-2-nonenal*, 4-ONE). Związki karbonylowe przedostają się do organizmu z pożywieniem, dymem tytoniowym i zanieczyszczeniami powietrza, ale decydujący wpływ ma synteza endogenna. Niewielkie ilości związków karbonylowych powstają fizjologicznie na drodze glikolizy, są jednak szybko zużywane na kolejnych etapach szlaku metabolicznego. Enzymatyczne utlenianie niektórych aminokwasów (treoniny, glicyny) także może prowadzić do formowania związków karbonylowych. Kolejne źródło związków karbonylowych stanowi szlak polioliowy, którego aktywacja w warunkach hiperglikemii odgrywa znaczącą rolę w patogenezie cukrzycy. Natomiast w PChN wzrasta znaczenie układu MPO -  $H_2O_2$  - HOCl, który w ramach reakcji wybuchu tlenowego doprowadza do syntezy związków karbonylowych z hydroksyaminokwasów (treonina, seryna, tyrozyna).

Związki karbonylowe powstają również na drodze nieenzymatycznej. Glikacja prowadzi do tworzenia zasad Schiffa, a następnie ARP, które w wyniku enolizacji, utlenienia, dehydratacji i fragmentacji ulegają przekształceniu w związki karbonylowe. Cukry mogą być źródłem związków karbonylowych nie tylko poprzez reakcje szlaku Amadori. Alternatywną drogę stanowi szlak Namiki, polegający na fragmentacji zasady Schiffa, oraz szlak Wolffa,

związany z autooksydacją cukrów katalizowaną przez jony metali przejściowych. W PChN postuluje się znaczącą rolę szlaku Wolffa, w którym związki karbonylowe powstają niezależnie od hiperglikemii, w warunkach nasilonego stresu oksydacyjnego. Drugą nieenzymatyczną ścieżką syntezy związków karbonylowych jest proces lipooksydacji, w którym wielonienasycone kwasy tłuszczowe ulegają fragmentacji pod wpływem RFT. Reakcje związków karbonylowych z nukleofilowymi grupami białek, kwasów nukleinowych i fosfolipidów prowadzą do powstania AGEs i ALEs. Trzecim efektem działania związków karbonylowych jest wzrost liczby grup karbonylowych w polipeptydach i białkach [74-75].

Zależności pomiędzy stresem karbonylowym a stresem oksydacyjnym, z uwzględnieniem mechanizmów prowadzących do stresu karbonylowego, zostały przedstawione na rycinie 9 (Ryc. 9).



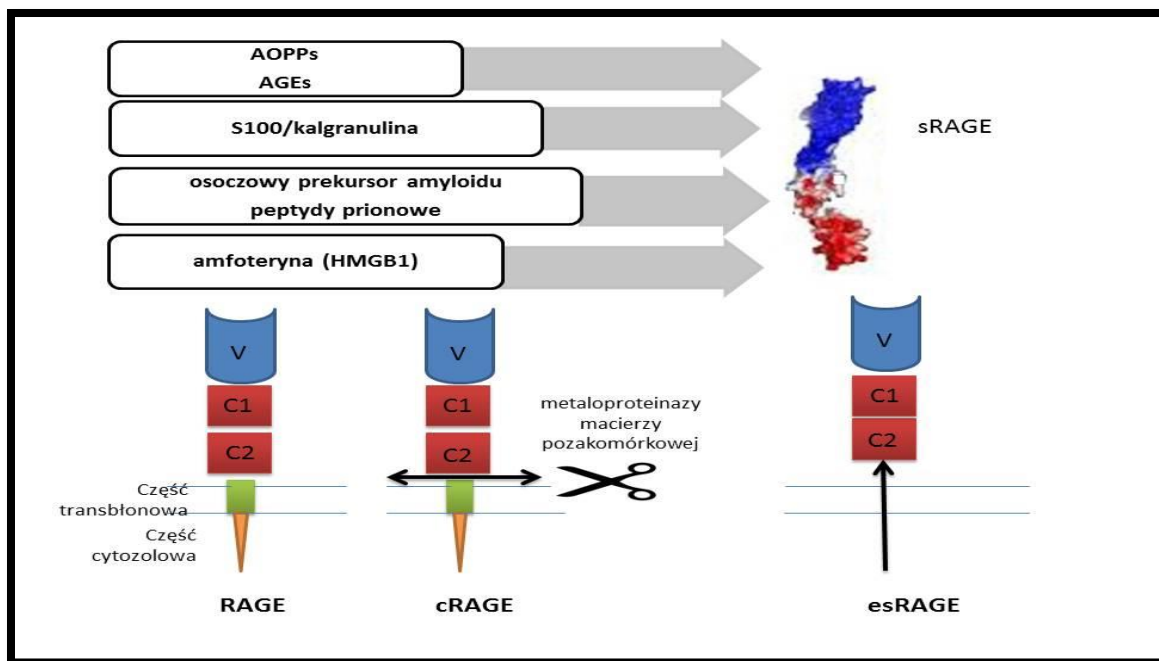
Ryc. 9. Schemat zależności pomiędzy stresem karbonylowym a stresem oksydacyjnym. Opracowanie własne.

Karbonylacja jest procesem nieodwracalnym, a białka, które jej uległy, są degradowane w proteasomach. Za rozkład białek odpowiedzialne są dwa typy proteasomów: 26S, zależny od ubikwityny i ATP, oraz 20S, niezależny do ubikwityny i ATP. W warunkach stresu oksydacyjnego zdolność komórki do rozkładu białek jest obniżona, gdyż aktywność proteasomu 26S maleje, a aktywność proteasomu 20S nie zmienia się, mimo nasilonego gromadzenia w komórce zmodyfikowanych białek. Prowadzi to do kumulacji karbonylowanych białek w ustroju, co upośledza ich funkcje, przyczyniając się do nasilenia zaburzenia homeostazy wewnątrzustrojowej. Dochodzi wtedy do utraty aktywności enzymów i hamowania szlaków metabolicznych oraz do zaburzenia interakcji pomiędzy poszczególnymi białkami lub białkami i ich niskocząsteczkowymi ligandami. Ponadto karbonylacja reszt lizynowych może doprowadzić do oporności na ubikwitynację, co skutkuje wydłużeniem czasu półtrwania i gromadzeniem białek w ustroju. Karbonylacja białek związana jest ze stresem retikulum endoplazmatycznego i z autofagią oraz z wprowadzaniem komórki na drogę apoptozy. W szczególny sposób karbonylacja może przyczynić się do zwiększenia stresu oksydacyjnego poprzez uszkodzenie białek kluczowych dla funkcjonowania mitochondriów i rozprzęgnięcia łańcucha oddechowego [76-77].

#### **1.3.4. ROZPUSZCZALNA POSTAĆ RECEPTORA DLA ZAAWANSOWANYCH PRODUKTÓW GLIKACJI**

RAGE, receptor zaliczany do rodziny immunoglobulin, obecny jest na wielu typach komórek: monocytach/makrofagach, podocytach, komórkach śródbłónka i adipocytach. Zbudowany jest z części cytozolowej, części transbłonowej i części zewnątrzkomórkowej, w której wyróżnia się domenę zmienną (V), odpowiadającą za wiązanie ligandu, oraz dwie domeny stałe (C1 i C2) [78]. Gen kodujący RAGE, znajdujący się na chromosomie 6, wchodzi w skład genów głównego układu zgodności tkankowej [79]. Pre-mRNA genu RAGE może ulegać alternatywnemu splicingowi, w wyniku czego powstają izoformy RAGE o krótszym łańcuchu polipeptydowym. W efekcie na powierzchni komórek śródbłónka, oprócz RAGE o pełnej długości, występuje także RAGE pozbawiony domeny V, który związany jest z hamowaniem wzrostu śródbłónka i angiogenezy. Z kolei RAGE pozbawiony części cytozolowej, czyli dominujący negatywny RAGE (ang. *dominant negative receptor for advanced glycation end products*, dnRAGE), wiąże ligandy, ale nie przekazuje sygnału do wnętrza komórki, co powoduje wyciszenie stymulacji RAGE o pełnej długości łańcucha [78].

Postaci rozpuszczalne RAGE (ang. *soluble receptor for advanced glycation end products*, sRAGE) znajdują się w osoczu i pozbawione są domeny transbłonowej oraz cytozolowej (Ryc. 10). Zalicza się do nich dwa typy: endogenne rozpuszczalne RAGE (ang. *endogenous secretory receptor for advanced glycation end products*, esRAGE) i cleaved RAGE (ang. *cleaved receptor for advanced glycation end products*, cRAGE). esRAGE powstaje w wyniku alternatywnego splicingu pre-mRNA genu RAGE. C-końcowy odcinek zawiera unikalną sekwencję złożoną z 16 aminokwasów, która odpowiada za immunogenność esRAGE. esRAGE może ulec potranslacyjnej modyfikacji, która polega na N-glikozylacji, w wyniku czego w osoczu występuje dominująca postać glikozylowana (o masie 50kDa) i postać niezmodyfikowana (o masie 46 kDa). Natomiast cRAGE uwalniany jest do osocza w wyniku działania metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej na cząsteczki RAGE zakotwiczone w błonach komórkowych. Izoforny cRAGE obejmują postaci pozbawione nie tylko domeny cytozolowej i transbłonowej, ale także postaci niezawierające domeny V, które nie mają zdolności wiązania ligandu. U osób zdrowych stosunek osoczowego stężenia sRAGE do esRAGE wynosi 5:1 [80-81]. Cząsteczki sRAGE mogą ulec czasowemu zakotwiczeniu na powierzchni komórek lub macierzy pozakomórkowej dzięki powinowactwu do łańcucha siarczanu heparanu. Dopiero po związaniu z ligandem dochodzi do zmniejszenia powinowactwa do siarczanu heparanu i odłączenia receptora. Kompleks sRAGE - ligand jest następnie uwalniany do osocza, a finalnie ulega degradacji w wątrobie i śledzionie. W ten sposób sRAGE – zarówno jako esRAGE, jak i jako cRAGE – zmniejsza ryzyko związania ligandu z natywnym RAGE na powierzchni komórki i rozwoju odpowiedzi komórkowej [70,78]. Na rycinie 10 przedstawiono schemat powstawania sRAGE.



Ryc. 10. Schemat powstawania sRAGE. Opracowano na podstawie [210].

RAGE jest receptorem multiligandowym. Wiąże się z produktami działania RFT: zarówno z AGEs, jak i z AOPPs. Do grupy ligandów RAGE zalicza się również białka z rodziny S100/kalgranulin (S100A7, S100B, S100A12, S100P), których cechą charakterystyczną budowy jest motyw EF wiążący jony wapnia. Są one wydzielane przez aktywowane neutrofile i monocyty/makrofagi. Poszczególne białka S100/kalgranuliny wiążą się z RAGE w różny sposób [82]. Białka z grupy S100/kalgranulin mogą działać na komórki śródbłonna i mięśni gładkich jako cytokiny prozapalne. Wpływają również na rozrost i apoptozę neuronów ośrodkowego układu nerwowego. Wykazano też udział białek S100/kalgranulin w procesie rozwoju nowotworów (raka piersi, jelita grubego, płuc, neuroblastomy) [82]. Kolejnym ligandem RAGE jest białko HMGB1, które występuje w jądrze komórkowym jako niehistonowe białko wiążące DNA. Potranslacyjna modyfikacja umożliwia przesunięcie HMGB1 do cytozolu, gdzie jest uznawana za marker niedojrzałych neuronów. HMGB1 może także ulec sekrecji pozakomórkowej przez aktywowane neutrofile, monocyty/makrofagi i komórki śródbłonna albo też ulec uwolnieniu z martwiczych komórek, w wyniku czego pojawia się w osoczu. HMGB1 łączy się z C-końcowym fragmentem RAGE, aktywując szlaki kinaz aktywowanych mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK), w tym kinaz JNK i kinaz ERK. Udowodniono udział HMGB1 zarówno w procesie rozrostu nowotworów i tworzenia przerzutów, jak i w procesie zapalenia [83]. Ponadto RAGE może wiązać się z patologicznymi białkami: prekurosorem amyloidu A w amyloidozie

wtórnej oraz peptydami prionowymi. Powinowactwo do RAGE wykazują także białka błonowe takie jak białko Mac-1, zaliczane do integrzyn obecnych na powierzchni leukocytów. Interakcja RAGE – Mac-1 powoduje gromadzenie leukocytów w ognisku zapalnym [78].

Pobudzenie transbłonowego RAGE przez połączenie z ligandem skutkuje aktywacją szlaków związanych z kinazami MAPK. Konsekwencją tego procesu jest uwolnienie czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B z połączenia z białkiem inhibitorowym (I $\kappa$ B). Fosforylacja białka inhibitorowego (I $\kappa$ B) powoduje dysocjację kompleksu, co umożliwia transport czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B do jądra i transkrypcję genów cytokin (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i  $\beta$ ), chemokin (MIP), cząstek adhezyjnych (VCAM-1, ICAM-1), immunoglobulin i enzymów (COX-2, fosfolipaza A2, lizozym). Czynnikiem transkrypcyjnym NF- $\kappa$ B odpowiada także za transkrypcję genów niektórych enzymów antyoksydacyjnych jak mitochondrialna SOD-2 [84-85]. Należy zauważyć, że promotor genu RAGE także może wiązać się z czynnikiem transkrypcyjnym NF- $\kappa$ B, co w mechanizmie dodatniego sprzężenia zwrotnego nasila ekspresję genu RAGE i zwiększa obecność RAGE na powierzchni komórki [86]. Kolejnym następstwem połączenia RAGE z ligandem jest aktywacja Nox. Wykazano, że w komórkach śródbłonna oraz monocytach/makrofagach skutkiem pobudzenia RAGE jest wzrost produkcji RFT w wyniku nasilonej aktywności Nox [87].

sRAGE wiąże się z ligandami, dzięki czemu zmniejsza prawdopodobieństwo ich interakcji z RAGE na powierzchni komórek. Jest to mechanizm obronny, który rozwija się w odpowiedzi na gromadzenie się w ustroju potencjalnych ligandów RAGE, w wyniku stresu oksydacyjnego i karbonylowego, stanu zapalnego oraz spadku funkcji nerek [70].

### 1.3.5. 3-NITROTYROZYNA

Reaktywne formy azotu (ang. *reactive nitrogen species*, RFA), analogicznie jak RFT, cechują się znacznym potencjałem utleniającym i krótkim okresem półtrwania, wynikającym z ich zdolności do wchodzenia w reakcję z innymi cząsteczkami. Do RFA zalicza się zarówno wolne rodniki, jak i związki nieposiadające niesparowanego elektronu. RFT i RFA reagują ze sobą, co prowadzi do powstawania kolejnych, wysoce reaktywnych związków i dalszego zaburzenia równowagi redox w ustroju.

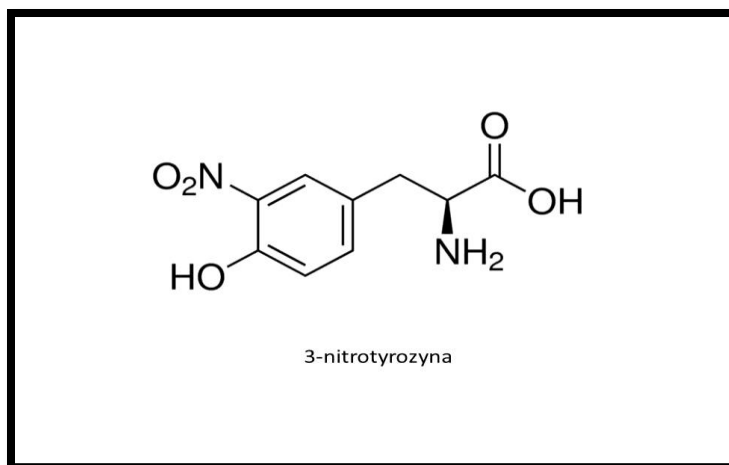
Kluczowym związkiem w procesach związanych z RFA jest tlenek azotu (NO). W warunkach prawidłowych jest on syntetyzowany przez syntazę tlenku azotu (NOS) z L-argininy i tlenu przy udziale kofaktorów: fosforanu dinukletydu nikotynamidoadeninowego (NADPH), dinukletydu flawinoadeninowego (FAD), mononukleotydu flawinoadeninowego

(FMN), tetrahydrobiopteryny (BH<sub>4</sub>). Syntaza tlenu azotu występuje w trzech izoformach, z których dwie – neuronalna (ang. *neuronal nitric oxide synthase*, nNOS) i śródbłonkowa (ang. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) – są enzymami konstytutywnymi, odpowiedzialnymi za stałą, fizjologiczną syntezę NO w komórce. Natomiast indukowalna syntaza tlenu azotu (ang. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) syntetyzowana jest w wyniku działania szeregu cytokin prozapalnych (IL-1, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ) i generuje kilkadziesiąt razy więcej NO niż izoformy konstytutywne. NO – jako cząsteczka mała, hydrofobowa, o stosunkowo długim okresie półtrwania w porównaniu z innymi RFT i RFA – łatwo przenika przez błony i rozprzestrzenia się w ustroju. W warunkach stresu oksydacyjnego wzrasta dostępność RFT, które reagują z NO. Produktem reakcji NO z O<sub>2</sub><sup>-</sup> jest ONOO<sup>-</sup>, który z kolei reaguje z kolejnymi cząsteczkami (jak dwutlenek węgla) i jonami (jak jon wodorowy). ONOO<sup>-</sup> jako kwas nadtlenoazotawy (ONOOH) ma zdolność przenikania przez błony, co ułatwia jego rozprzestrzenianie. Może on ulec reakcji homolitycznego rozkładu do dwutlenku azotu (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) i HO<sup>•</sup>. Z kolei homoliza nitrozonadtlenowęglanu (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>) prowadzi do powstania NO<sub>2</sub><sup>•</sup> i anionorodnika węglanowego (CO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Natomiast w obecności silnego utleniacza, jakim jest HO<sup>•</sup>, NO ulega utlenieniu do kationu nitrozonowego (NO<sup>+</sup>) [88-89]. Ochronna rola enzymów antyoksydacyjnych jest znacznie ograniczona ze względu na dużą reaktywność powstających związków. Dysmutacja O<sub>2</sub><sup>-</sup> katalizowana przez SOD przebiega znacznie wolniej, niż reakcja O<sub>2</sub><sup>-</sup> z NO [90]. W efekcie obserwuje się znaczący wzrost RFA w ustroju, co doprowadza do uszkodzenia związków wielkocząsteczkowych. Zarówno ONOO<sup>-</sup>, jak i jego pochodna - nitrozonadtlenowęglan (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>), mają zdolność modyfikacji reszt aminokwasowych. S-nitrozylacja reszt metioniny i cysteiny prowadzi do powstawania sulfotlenku, podczas gdy nitracja reszt tryptofanu i tyrozyny skutkuje pojawianiem się grupy nitrowej (-NO<sub>2</sub>) w pierścieniu aromatycznym. Tłuszcze, cukry i kwasy nukleinowe również mogą ulegać atakowi RFA, co prowadzi do nitracji kwasów tłuszczowych, powstawania nitrozowych pochodnych glukozy oraz 8-nitro-guaniny [89,91].

Biologiczna wydajność nitracji reszt tyrozynowych wynosi 1-5 na 10000 reszt [92]. Jednak u pacjentów z PChN, ze względu na zwiększoną produkcję RFT i RFA, stwierdza się kumulację produktów stresu azotowego. Nitracja obejmuje białka osocza takie jak: albumina, łańcuchy  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  fibrynogeny, ceruloplazmina, transferyna, haptoglobina, alfa-1-antytrypsyna, czynnik D dopełniacza oraz immunoglobuliny [93].

3-nitrotyrozyna (Ryc. 11) powstaje najczęściej na drodze pośredniej modyfikacji reszty tyrozynowej (Ryc. 12).

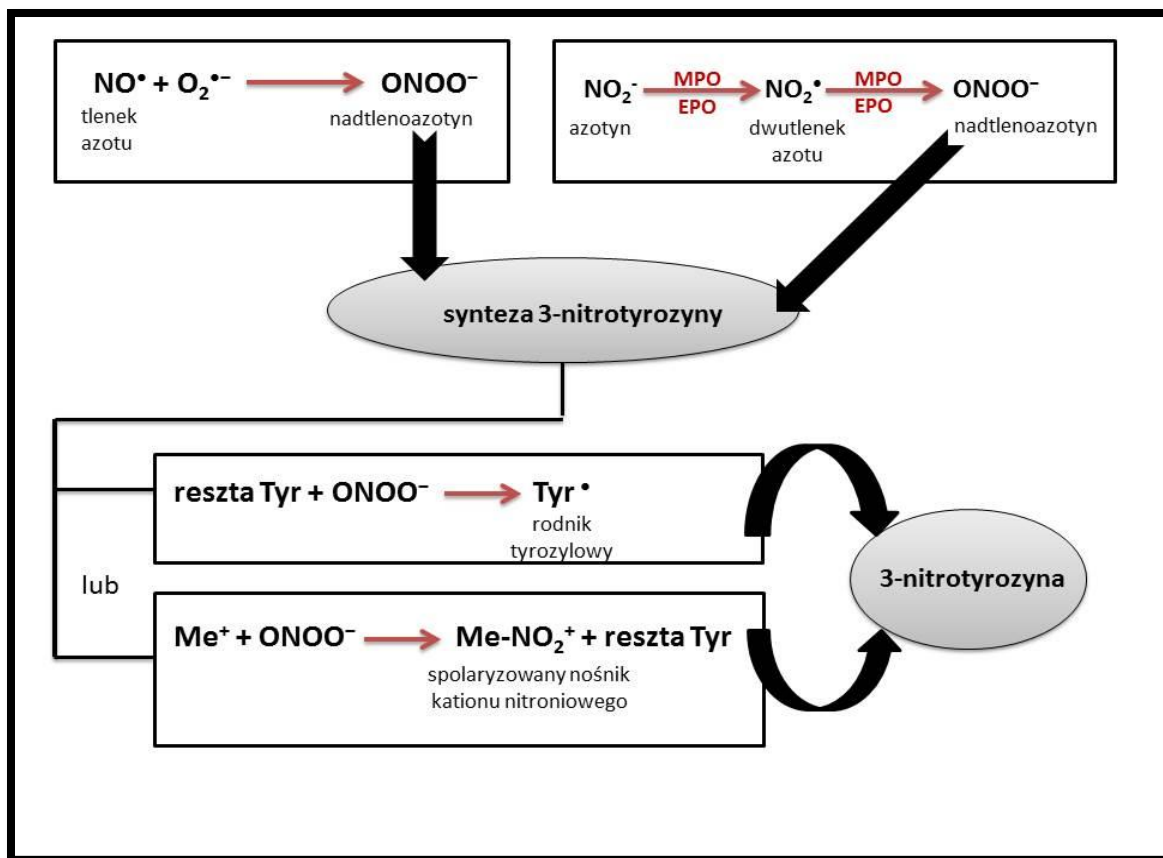




Ryc. 11. Wzór strukturalny 3-nitrotyrozyny. Opracowano na podstawie [241].

W pierwszym etapie powstawania 3-nitrotyrozyny dochodzi do ataku  $\text{ONOO}^-$  na resztę tyrozynową, co skutkuje powstaniem nietrwałego rodnika tyrozyłowego, który następnie ulega przekształceniu do 3-nitrotyrozyny. Alternatywna droga przemian obejmuje dimeryzację rodnika tyrozyłowego, co prowadzi do pojawienia się 3,3-dityrozyny i tworzenia wiązań krzyżowych w obrębie cząsteczki białka [91,94]. Znaczący udział w syntezie 3-nitrotyrozyny odgrywają enzymy z grupy peroksydaz: MPO oraz peroksydaza eozynofilii (ang. *eosinophil peroxidase*, EPO), które produkowane są przez leukocyty w stanie zapalnym oraz w przebiegu reakcji nadwrażliwości. Katalizują one utlenianie azotynu ( $\text{NO}_2^-$ ): jednoelektronowe – do dwutlenku azotu ( $\text{NO}_2^{\cdot}$ ) oraz dwuelektronowe – do  $\text{ONOO}^-$  [95].

Badania na modelach zwierzęcych uwodniły znaczące różnice co do udziału peroksydaz w formowaniu 3-nitrotyrozyny w zależności od lokalizacji i etiologii stanu zapalnego. Ponadto zaobserwowano, że nasilenie syntezy 3-nitrotyrozyny nie koreluje z nasileniem powstawania innych produktów działania peroksydaz: 3-chlorotyrozyny i 3-bromotyrozyny. Ze względu na możliwość ograniczonego dopływu  $\text{NO}_2^-$ , peroksydazy *in vivo* odgrywają większą rolę w nitrowaniu reszt aminokwasowych białek pozakomórkowych, niż wewnątrz komórki [95]. Nitrowanie może też przebiegać z udziałem jonów metali przejściowych. W pierwszym etapie  $\text{ONOO}^-$  tworzy kompleks z kationem metalu przejściowego, dzięki czemu powstaje spolaryzowany nośnik kationu nitroniowego ( $\text{NO}_2^+$ ). Następnie spolaryzowany nośnik przeprowadza atak na resztę tyrozynową, co skutkuje powstaniem 3-nitrotyrozyny [92].



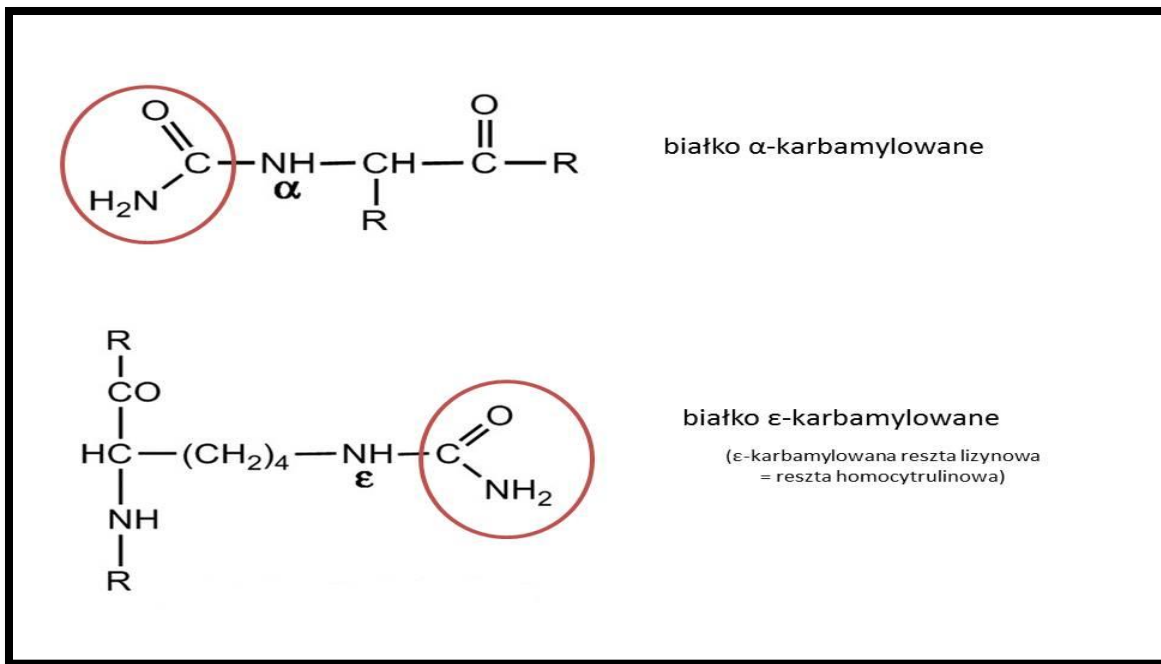
Ryc. 12. Powstawanie 3-nitrotyrozyny. Opracowanie własne.

Wpływ RFA na poszczególne typy komórek nerki zależy od sprawności ich mechanizmów antyoksydacyjnych. Część prac wskazuje na komórki mezangium kłębuszka jako najbardziej odporne na atak RFA ze względu na dobrze rozwinięty system obronny, który umożliwia prawidłowe funkcjonowanie komórek nawet przy znacznej aktywności iNOS. Z kolei komórki śródbłonka w kłębuszku oraz podocyty wydają się szczególnie wrażliwe na atak RFA. W efekcie dochodzi zarówno do apoptozy komórek kłębuszka, jak i do transformacji fenotypowej w kierunku fibroblastów [96]. Badania graftów, które uległy procesowi przewlekłego odrzucania, także dostarczyły dowodów na zróżnicowanie skutków działania RFA w poszczególnych tkankach nerki. Znaczne nasilenie nitracji dotyczyło mitochondrialnej SOD-2 w nabłonku kanalików nerkowych [97]. Stwierdzono również, że kumulacja 3-nitrotyrozyny w odrzuconych graftach dotyczy głównie śródmiąższu i kanalików, a nie kłębuszków [98]. Na modelach zwierzęcych również udowodniono, że uszkodzenie nerek wiąże się z dyaniem RFA. U szczurów podanych 5/6 nefrektomii zaobserwowano gromadzenie 3-nitrotyrozyny w pozostałej tkance nerki, a także w innych narządach (serce, aorta, mózg, wątroba) [99]. Badania modeli zwierzęcych potwierdziły także

wpływ RFA – ocenianego przez gromadzenie się 3-nitrotyrozyny w tkankach - na włóknienie nerek w przebiegu PChN [100-101].

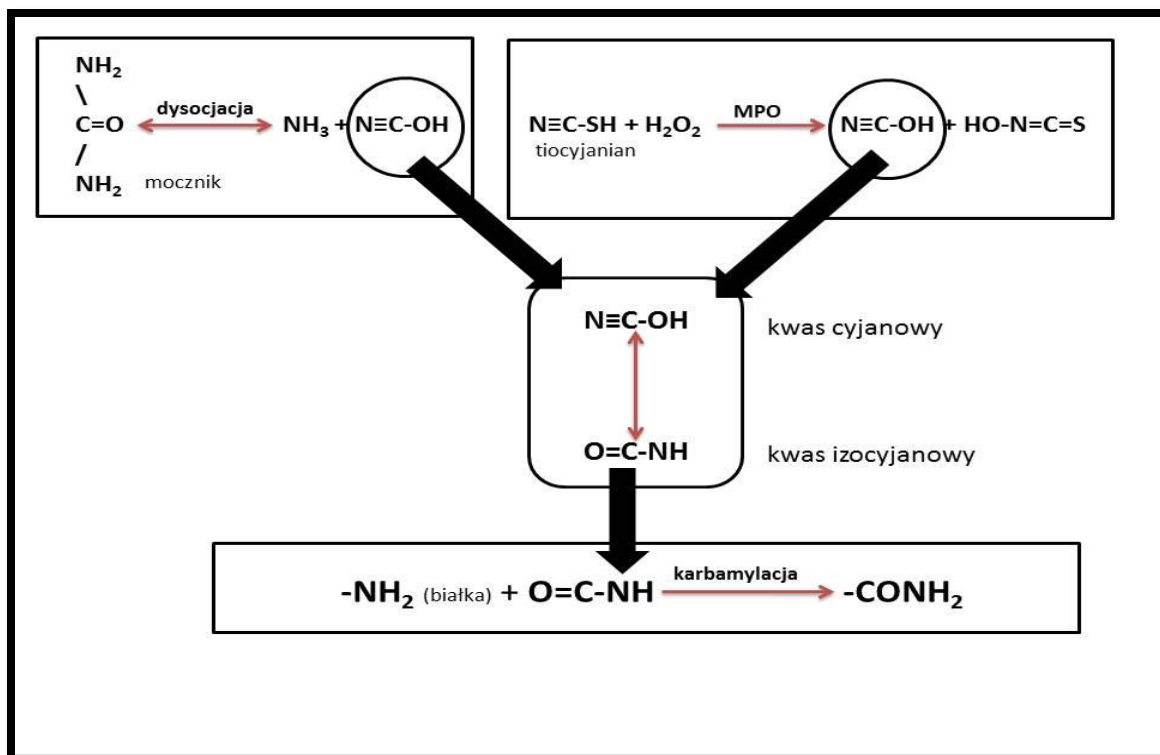
### 1.3.6. GRUPY KARBAMYLOWE BIAŁEK

Karbamylacja to nieenzymatyczna modyfikacja białek, analogiczna do procesu glikacji, ale zachodząca przy udziale kwasu cyjanowego. Kwas cyjanowy powstaje jako produkt dysocjacji mocznika. W warunkach fizjologicznych stosunek stężenia kwasu cyjanowego do stężenia mocznika wynosi przeciętniej mniej niż 1:100 [102]. Wraz z spadkiem wydolności nerek i akumulacją mocznika dochodzi do koncentracji kwasu cyjanowego. Jednak u pacjentów ze SNN stężenie kwasu cyjanowego jest ok. tysiąc razy niższe, niż wynikałoby to ze stężenia mocznika. U chorych hemodializowanych obserwuje się stężenie kwasu cyjanowego sięgające  $141 \pm 45$  nmol/l przed zabiegiem hemodializy, podczas gdy u zdrowych kwas cyjanowy osiąga stężenie  $45 \pm 22$  nmol/l [103]. Przyczynę tej rozbieżności stanowi duża reaktywność kwasu cyjanowego. Tautomer kwasu cyjanowego, kwas izocyjanowy, łatwo wchodzi w reakcję z szeregiem różnych typów grup funkcyjnych białek. Kwas cyjanowy może również powstawać przy udziale MPO, enzymu wybuchu tlenowego, którego aktywność rośnie w przebiegu stanu zapalnego. MPO, w obecności  $H_2O_2$ , katalizuje utlenianie tiocyjanianu, pochodzącego z pokarmów lub z dymu tytoniowego, do kwasu cyjanowego [104]. In vitro kwas izocyjanowy najłatwiej reaguje z grupami tiolowymi i fenolowymi, ale reakcje te są odwracalne i nie zmieniają trwale struktury białka. Odmienne zachowują się grupy aminowe, które w wyniku reakcji z kwasem izocyjanowym ulegają nieodwracalnej przemianie do grup karbamoilowych ( $-CONH_2$ ). Najszybciej wchodzi w reakcje karbamylacji grupy  $\alpha$ -aminowe, podczas gdy grupa  $\epsilon$ -aminowa lizyny reaguje z kwasem izocyjanowym około 100 razy wolniej. Z tego względu wolne aminokwasy ulegają głównie  $\alpha$ -karbamylacji, podczas gdy źródłem homocytruliny ( $\epsilon$ -amino-karbamylowanej lizyny) jest przede wszystkim katabolizm białek o długim czasie półtrwania, których reszty lizynowe zdążyły ulec  $\epsilon$ -karbamylacji (Ryc. 13). Kwas izocyjanowy może także reagować z grupami karboksylowymi, natomiast in vitro nie stwierdza się reakcji pomiędzy kwasem izocyjanowym a grupami hydroksylowymi. Oprócz kwasu izocyjanowego źródłem grup karbamoilowych może być także karbamoilofosforan [105-106].



Ryc. 13. Budowa strukturalna białek karbamylowanych. Opracowano na podstawie [221].

Rolę mechanizmu ochronnego, zmniejszającego ryzyko karbamylacji białek strukturalnych i enzymatycznych, pełnią wolne aminokwasy, do których kwas izocyjanowy ma wyższe powinowactwo, niż do reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym. W SNN obserwuje się wzrost stężenia karbamylowanych wolnych aminokwasów w stosunku do niezmodyfikowanych wolnych aminokwasów. Najczęściej karbamylacji ulega izoleucyna i treonina, natomiast najniższy wskaźnik karbamylacji wykazują tyrozyna i fenyloalanina [106-107]. Schemat ukazujący powstawanie białek karbamylowanych został przedstawiony na rycinie 14 (Ryc. 14).



Ryc. 14. Powstawanie białek karbamylowanych. Opracowanie własne.

Karbamyłacja jest procesem zmieniającym strukturę białka, prowadzącym do zaburzenia funkcji i wpływającym na katabolizm białka. Ulegają jej zarówno białka osoczowe, jak i białka macierzy. Na modelu zwierzęcym udowodniono, że karbamylowana albumina cechuje się większą nefrotoksycznością, niż albumina niezmodyfikowana. W kanalikach eksponowanych na karbamylowaną albuminę dochodzi do większego zwłóknienia okołocewkowego oraz zwiększonej obecności fibronektyny, czynników wazokonstrykcyjnych: endoteliny-1 (ang. *endothelin 1*, ET-1) oraz czynników wzrostu, w tym płytkopochodnego czynnika wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor*, PDGF), czynnika wzrostu naskórka (ang. *epidermal growth factor*, EGF) i TGF- $\beta$  [108]. Z kolei *in vitro* wykazano, że karbamylowana albumina stymuluje proliferację komórek mezangium kłębuszków nerkowych oraz sprzyja ich transformacji fenotypowej w kierunku fibroblastów. Równoczesny wzrost syntezy kolagenu I i IV nasila włóknienie kłębuszków i upośledzenie funkcji wydalniczej nerki [109]. Ocena materiału biopsyjnego od chorych z PChN wykazała, że homocytrulina ( $\epsilon$ -amino-karbamyłowana lizyna) gromadzi się głównie w komórkach mezangium i błonie podstawnej kłębuszka oraz w komórkach nabłonka kanalików, natomiast bardzo rzadko pojawia się w torebce Bowmana. Ponadto nie stanowi ona elementu składowego złogów zawierających immunoglobuliny lub komplement, ale

najprawdopodobniej jej obecność wynika z karbamyłacji białek tkanki nerki in situ. Nie stwierdzono natomiast gromadzenia homocytruliny w biopsjach od chorych z izolowanym białkomoczem i prawidłowym stężeniem mocznika ani w biopsjach od żywych dawców nerek [110]. Badania na modelach zwierzęcych również potwierdzają kumulację w obrębie nerek zarówno homocytruliny, jak i białek karbamyłowanych, wraz z rozwojem SNN [112].

Uszkodzenie narządów spowodowane karbamyłacją w dużej mierze związane jest z modyfikacją białek macierzy pozakomórkowej, które cechują się długim okresem półtrwania. Karbamyłowany in vitro kolagen charakteryzuje się lokalnymi zaburzeniami struktury potrójnej helisy, co wiąże się z jego opornością na działanie większości metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej, przy zwiększonej wrażliwości na działanie metaloproteinazy 2 (MMP-2) [113]. Równocześnie opisano hamujący wpływ karbamyłacji na aktywność MMP-2 [110]. W efekcie karbamyłacja wpływa nie tylko na właściwości fizykochemiczne kolagenu, ale i zakłóca jego katabolizm, co prowadzi do zwiększonego gromadzenia macierzy pozakomórkowej i nasilonego włóknienia. Nieprawidłowa struktura karbamyłowanego kolagenu utrudnia również tworzenie fibryli oraz interakcję cząsteczki kolagenu z neutrofilami [114]. Karbamyłacja białek przyczynia się też do zaburzeń hemostazy typowych dla PChN, w której obserwuje się zarówno skłonność do wykrzepiania, jak i objawy skazy krwotocznej. Z jednej strony, karbamyłowane LDL wykazują powinowactwo do receptora podobny do lektyny typu 1 wiążącego ox-LDL (ang. *lectin like oxidized LDL receptor-1*, LOX-1), a równocześnie nasilają ekspresję genu receptora LOX-1, genu czynnika tkankowego (ang. *tissue factor*, TF) oraz genu inhibitora aktywatora plazminogenu-1 (ang. *plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1), co wiąże się z przesunięciem równowagi w stronę zwiększonej aktywności prozakrzepowej. Efekt trombogenny wykazują zarówno karbamyłowane LDL wyizolowane z osocza chorych z SNN, jak i karbamyłowane LDL zsyntetyzowane in vitro [115]. Z drugiej strony, karbamyłacja fibrynogenu zmienia sam proces formowania się skrzepliny poprzez wpływ na polimeryzację fibryny i tworzenie wiązań krzyżowych. Zakłóceniu ulega również proces degradacji fibryny. W efekcie obserwuje się obniżoną wytrzymałość mechaniczną skrzepliny oraz nasiloną migrację neutrofilów w miejsce wykrzepiania, co przyczynia się do skazy krwotocznej [116]. Karbamyłowana albumina hamuje produkcję RFT w reakcji wybuchu tlenowego przeprowadzanej przez neutrofile, które oddziałują z kolagenem, co skutkuje spadkiem odporności i zwiększoną podatnością na zakażenia u chorych z PChN [117].

## **2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY**

Zaburzenie równowagi redox w przebiegu PChN skutkuje nasileniem stresu oksydacyjnego i karbonylowego, co prowadzi do modyfikacji wielu cząsteczek, w tym białek niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Ocena kumulacji zmodyfikowanych białek w osoczu nie tylko stanowi pośredni wykładnik nasilenia zaburzenia równowagi redox w ustroju, ale równocześnie pozwala na analizę wpływu stresu oksydacyjnego i jego pochodnych (glikacji, stresu karbonylowego i karbamyłacji) na patogenezę PChN. Ponadto związki powstające w wyniku działania RFT na białka mogą oddziaływać na rozwój odległych następstw PChN takich jak przewlekły stan zapalny, dyslipidemia, osteodystrofia nerkowa oraz zaburzenia gospodarki żelazowej i niedożywienie. Z kolei powikłania, do których dochodzi u pacjentów z PChN, mogą wpływać na nasilenie oksydacyjnych modyfikacji białek.

W pracy wyznaczono następujące cele:

1. Ocena wpływu stopnia zaawansowania PChN na nasilenie modyfikacji białek w wyniku stresu oksydacyjnego.
2. Porównanie wpływu metody leczenia nerkozastępczego na modyfikacje białek.
3. Ocena związku pomiędzy wybranymi modyfikacjami białek w PChN a powikłaniami typowymi dla PChN
4. Porównanie wybranych modyfikacji białek u pacjentów z PChN i pacjentów z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie.

### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1. CHARAKTERYSTYKA GRUP BADANYCH – KWALIFIKACJA DO BADANIA

Badaniem objęto 195 osób, w tym 126 chorych z rozpoznaną PChN, pozostających pod opieką Poradni Nefrologicznej, Poradni Dializ Otrzewnowych lub Stacji Dializ przy Szpitalu Klinicznym im. H. Świącickiego w Poznaniu (grupa NEFRO) oraz 69 osób, które stanowiły grupę porównawczą. Rekrutacja do badania trwała rok.

W grupie NEFRO, w zależności od stopnia upośledzenia funkcji nerek oraz rodzaju leczenia nerkozastępczego, zgodnie z kryteriami rozpoznania i klasyfikacji PChN wg KDIGO 2012, utworzono kilka podgrup. Przydział do grup opierał się na wielkości GFR, wyliczonego zgodnie z zaleceniami KDIGO 2012 – wg wzoru MDRD opartego o pomiar stężenia kreatyniny w surowicy, wyrażonego w [mg/dl]  $eGFR = 186 \times [\text{stężenie kreatyniny w mg/dl}]^{1,154} \times [\text{wiek}]^{-0,203} \times [0,724]$  dla płci żeńskiej.

- GRUPA PRE (n = 48) - chorzy w okresie pre-dializacyjnym (stadium G3b-G4 PChN) z umiarkowanym lub ciężkim zmniejszeniem eGFR (eGFR 44–29 ml/min/1,73m<sup>2</sup>),
- GRUPA SNN (n = 78) – chorzy w okresie SNN (eGFR < 15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) leczeni nerkozastępczo. W zależności od stosowanej metody leczenia nerkozastępczego wyróżniono tutaj dwie podgrupy, tj.:
  - podgrupa DO (n = 35) obejmująca chorych leczonych metodą dializy otrzewnowej, z wykorzystaniem standardowych płynów opartych na mleczanach i glukozie. W podgrupie tej początkowo, ze względu na technikę leczenia wydzielono dwie grupy, tj.: a) grupę (n = 15) leczonych techniką automatycznej dializy otrzewnowej (ang. *automatic peritoneal dialysis*, ADO), w której w godzinach nocnych cykler wykonywał automatyczną wymianę płynu w jamie otrzewnej, przy czym średni czas wymiany wynosił 10 godzin, a u części pacjentów w ciągu dnia stosowano dodatkowo 7,5% roztwór ikodekstryny; b) grupę chorych (n = 20) stosujących technikę ciągłej ambulatoryjnej dializy (ang. *continuous cycling peritoneal dialysis*, CADO), wykonujących codziennie 3 – 5 wymian płynu dializacyjnego w jamie otrzewnej, objętością 1,5 – 2,5 litra. U części pacjentów stosowano dodatkowo 7,5% roztwór ikodekstryny w pojedynczej, długiej wymianie. Gdy grupy były



analizowane oddzielnie nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy tymi dwoma technikami, być może ze względu na małą liczebność grup, stąd grupa pacjentów dializowanych otrzewnowo przedstawiona została w rozprawie jako całość i jako całość, czyli grupa DO, była analizowana.

- podgrupa HD (n = 43) obejmująca chorych leczonych metodą powtarzanej hemodializy. Zabiegi hemodializ wykonywane były u każdego pacjenta trzy razy w tygodniu, za pośrednictwem przetoki tętniczo-żylną z naczyń własnych lub sztucznych. Czas trwania hemodializ wynosił co najmniej 10 godzin/tydzień, z wykorzystaniem standardowych wodorowęglanowych płynów dializacyjnych oraz polisulfonowych dializatorów niskoprzepływowymi (low-flux). Przepływ krwi w czasie hemodializy wynosił 200-350 ml/min, przy średnim przepływie płynu dializacyjnego 500 ml/min.

Najczęstszą przyczyną PChN w grupie NEFRO stanowiła nefropatia nadciśnieniowa. Podgrupy w obrębie grupy NEFRO dobierano tak, aby nie różniły się zakresem przyjmowanych leków. Najczęściej stosowane leki obejmowały diuretyki pętlowe, inhibitory antagonistów konwertazy angiotensyny, antagonistów receptora angiotensyny II, blokery kanałów wapniowych, leki hipotensyjne o działaniu ośrodkowym (chlorowodorek klonidyny, metyldopa), leki blokujące receptory  $\alpha$ , wiązacze wapniowe (węglan wapnia lub octan wapnia), witaminę D i jej pochodne (alfakalcydol). Część pacjentów otrzymywała także leki stymulujące erytropoezę w iniekcjach podskórnych (chorzy z grupy PRE i DO) lub dożylnych (chorzy z grupy HD).

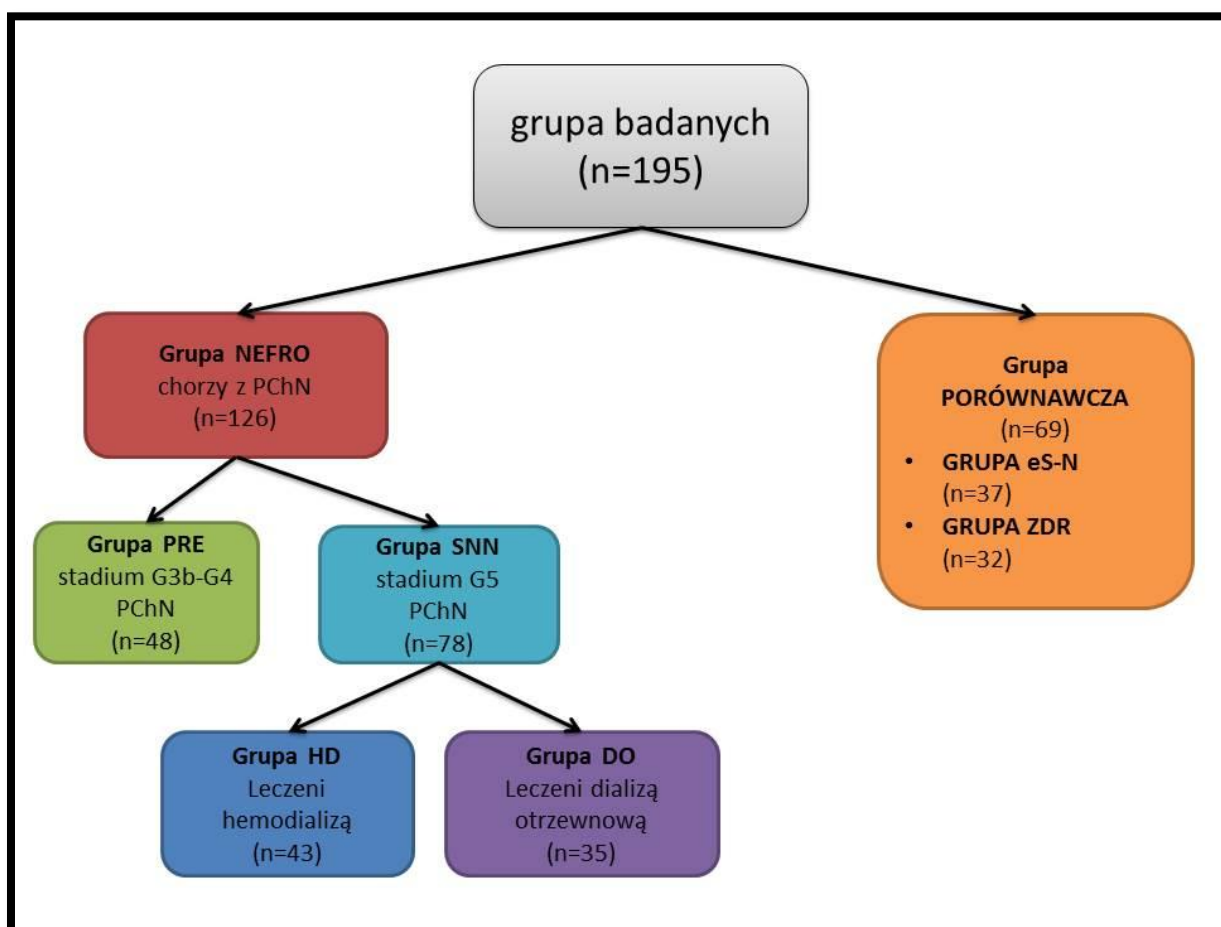
Grupa porównawcza (n = 69) objęła dwie grupy dopasowane pod względem płci i wieku do grupy NEFRO:

- grupa eS-N (n = 37) - zakwalifikowano tu chorych z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie, przyjętych do szpitala w celu wykonania planowej koronarografii, u których zarówno w wywiadzie, jak i w czasie włączenia do badania, nie stwierdzono cech upośledzenia funkcji nerek. Badania w tej grupie miały ukazywać zmiany, do jakich dochodzi pod wpływem chorób układu sercowo-naczyniowego, przy sprawnej funkcji nerek.

- grupa ZDR (n = 32) – utworzyły ją zdrowe osoby, bez jawnych cech upośledzenia funkcji nerek i układu krążenia w wywiadzie oraz w chwili włączenia do badania.

Wszystkie osoby zakwalifikowane do badania zostały poinformowane o jego celu i wyraziły pisemną zgodę na jego przeprowadzenie. Projekt badania przedstawiono Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu i uzyskano akceptację na jego przeprowadzenie (decyzja nr 275/16 z dnia 03 marca 2016 r.). Wśród wszystkich badanych przeprowadzono wywiad lekarski, wykonano badanie przedmiotowe i zapoznano się z dostępną dokumentacją medyczną.

Schemat podziału grupy osób zakwalifikowanych do badania przedstawiono na rycinie 15 (Ryc. 15).



Ryc. 15. Schemat podziału grupy osób zakwalifikowanych do badania.

Przyjęto następujące kryteria zakwalifikowania do badania dla wszystkich badanych:

- ukończony 18 rok życia,
- pisemne wyrażenie zgody na udział w badaniu,
- niepalenie papierosów od co najmniej 10 lat w wywiadzie,
- nienadużywanie alkoholu od co najmniej 10 lat w wywiadzie,
- brak cukrzycy oraz nieprawidłowej glikemii na czczo i/lub nieprawidłowej tolerancji glukozy,
- brak aktywnego procesu zapalnego,
- brak choroby nowotworowej albo choroba nowotworowa, której leczenie zakończono co najmniej 10 lat temu,
- brak leczenia immunosupresyjnego w wywiadzie,
- stabilna funkcja wątroby (nie więcej niż dwukrotnie podwyższona aktywność transaminaz), antygen HBs i przeciwciała anty-HCV ujemne,
- przeciwciała anty-HIV ujemne.

Ponadto, w przypadku pacjentów z grupy NEFRO, zastosowano następujące dodatkowe warunki włączenia do badania:

- brak dodatkowych współistniejących chorób, niewynikających w sposób bezpośredni lub pośredni z PChN,
- brak, w momencie włączenia do badania, ostrych powikłań sercowo-naczyniowych, tj. ostrej niewydolności krążenia, przełomu nadciśnieniowego, ostrego zespołu wieńcowego.

Jednocześnie, w zależności od stosowanej techniki leczenia nerkozastępczego, ustalono dodatkowe kryteria włączenia dla każdej z podgrup:

➤ w grupie HD:

- minimum 6 miesięcy leczenia powtarzaną hemodializą, 3 razy w tygodniu, przez minimum 10 godzin/tydzień,
- przetoka tętniczo-żylna jako dostęp naczyniowy do hemodializ,
- oszacowany wskaźnik adekwatności dializy (eKt/V) co najmniej 1,2.

➤ w grupie DO:

- czas leczenia DO minimum 6 miesięcy,
- $Kt/V \geq 1,8$  l/tydzień/ $1,73m^2$ .

W przypadku pacjentów z grupy eS-N dodatkowe warunki obejmowały:

- brak jawnych cech upośledzenia funkcji nerek w wywiadzie oraz w chwili włączenia do badania, funkcja nerek oceniona na podstawie eGFR oraz wskaźnika albumina/kreatynina w moczu,
- dusznica bolesna w wywiadzie,
- udokumentowana obecność co najmniej jednego ostrego zespołu wieńcowego w wywiadzie,
- przyjęcie do Oddziału Klinicznego Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych w celu wykonania planowej koronarografii,
- w dniu zakwalifikowania do badania bez cech ostrego zespołu wieńcowego,
- brak dodatkowych współistniejących chorób, czyli takich, które nie wynikają w sposób bezpośredni lub pośredni z choroby wieńcowej.

Z kolei dla grupy ZDR dodatkowe warunki obejmowały:

- brak jawnych cech upośledzenia funkcji nerek w wywiadzie oraz w chwili włączenia do badania, funkcja nerek oceniona na podstawie eGFR oraz wskaźnika albumina/kreatynina w moczu,
- brak jawnych cech upośledzenia funkcji układu krążenia w wywiadzie oraz w chwili włączenia do badania, oszacowane na podstawie prawidłowej wartości ciśnienia tętniczego ( $<140/90$  mmHg), braku odchyłeń w badaniu podmiotowym i przedmiotowym,
- nieprzyjmowanie na stałe żadnych leków.

Wszystkie grupy scharakteryzowano pod względem wieku i płci. Wyniki oceny demograficznej grup zostały przedstawione w Tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka grupy badanych pod względem danych demograficznych

	Grupa badanych (n=195)					p*
	ZDR (n=32)	eS-N (n=37)	NEFRO (n=126)			
			PChN G3b-G4	SNN		
			PRE (n=48)	DO (n=35)	HD (n=43)	
Podstawowe informacje						
wiek [lata]	57,88 ± 10,11	59,84 ± 8,33	62,65 ± 10,72	52,83 ± 18,33	55,07 ± 15,47	0,04
kobiety/mężczyźni [n]	12/20	12/25	18/25	15/20	15/28	ns

\* Analizy porównawcze dla zmiennych o charakterze ilościowym wykonano nieparametrycznym testem Kruskala-Wallisa, analizy porównawcze dla zmiennych o charakterze jakościowym wykonano test  $\chi^2$ . Dane ilościowe przedstawiono w postaci średnich wartości wraz z odchyleniem standardowym (średnia ± odchylenie standardowe). Wartość p została zaokrąglona do części setnych, jeśli różnice pomiędzy grupami były istotne statystycznie (p-value < 0,05). W przypadku, gdy nie wykazano istotnie statystycznych różnic pomiędzy grupami (p-value > 0,05) wprowadzono oznaczenie „ns”.

## 3.2. METODYKA BADAŃ

### 3.2.1. POBIERANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK KRWI

Próbki krwi od wszystkich osób zakwalifikowanych do badania były pobierane w możliwie zbliżonym okresie czasu, tak aby nie różniły się znacząco okresem przechowywania.

Procedura pobraniowa była identyczna we wszystkich badanych grupach. U wszystkich osób próbki krwi były pobierane na czczo, w godzinach pomiędzy 8:00 a 9:00. Jedynie pobranie krwi od pacjentów dializowanych musiało być zsynchronizowane z harmonogramem dializ.

Pacjenci hemodializowani mieli pobieraną krew rano (przed podaniem heparyny) przed drugą dializą w tygodniu, w dniu, w którym mieli zaplanowane wykonanie rutynowych badań kontrolnych krwi. Pacjenci dializowani otrzewnowo – zarówno leczeni techniką ADO, jak i techniką CADO – mieli pobieraną krew rano, w czasie rutynowej, wykonywanej raz na 6 tygodni, wizyty kontrolnej w poradni.

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

### 3.2.2. OZNACZANIE PARAMETRÓW

We wszystkich grupach oznaczano szereg parametrów laboratoryjnych:

- morfologię krwi - oceniono przy użyciu analizatora hematologicznego Sysmex K-4500 firmy ICN;
- parametry gospodarki żelazowej: stężenie żelaza i całkowitą zdolność wiązania żelaza – zbadano przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus firmy Roche Diagnostics, utajoną zdolność wiązania żelaza wyznaczono na podstawie równania, w którym od całkowitej zdolności żelaza odjęto wartość stężenia żelaza w osoczu, stężenie ferrytyny – oznaczono przy użyciu analizatora biochemicznego Modular E-170 firmy Roche Diagnostics;
- stężenie glukozy – oceniono przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus firmy Roche Diagnostics;
- parametry gospodarki lipidowej: stężenie cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości (ang. *high density lipoproteins*, HDL-C) oraz trójglicerydów (ang. *triglycerids*, TG) – oceniono przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus firmy Roche Diagnostics, natomiast stężenie cholesterolu frakcji lipoprotein o niskiej gęstości LDL (ang. *low density lipoproteins*, LDL-C) wyznaczono na podstawie równania Friedewalda:  $\text{LDL-C [mmol/l]} = \text{cholesterol całkowity} - \text{HDL-C} - \text{TG}/2,2$ ;
- parametry gospodarki wątrobowej: aktywność transaminazy alaninowej, transaminazy asparaginianinowej, fosfatazy zasadowej – zbadano przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus firmy Roche Diagnostics;
- stężenie kreatyniny metodą kolorymetryczną wg Jaffe – oceniono przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus firmy Roche Diagnostics, stężenie mocznika - przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus firmy Roche Diagnostics;
- stężenie albumin i białka całkowitego – zbadano przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus firmy Roche Diagnostic;

- parametry gospodarki wapniowo-fosforanowej: stężenie wapnia całkowitego i zjonizowanego oraz stężenie fosforanów – zbadano przy użyciu analizatora biochemicznego Cobas Integra 400 plus firmy Roche Diagnostics; stężenie PTH - przy użyciu analizatora biochemicznego Modular E-170 firmy Roche Diagnostics, stężenie białka Klotho i FGF23 - testem immunoenzymatycznym (ELISA) przy użyciu zestawów firmy Shanghai Sunred Biological Company Co;
- wybrane parametry stanu zapalnego: stężenie wysoce czułego białka C-reaktywego (hsCRP) w surowicy krwi oznaczano metodą immunonefelometryczną, przy użyciu testów o wysokiej czułości high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) firmy DADE Behring, USA i nefelometru DADE Behring Analyzer II;
- wybrane parametry stresu oksydacyjnego: stężenie AOPPs, AGEs, CML, 3-nitrotyrozyny – oznaczono testem immunoenzymatycznym (ELISA) przy użyciu zestawów firmy Shanghai Sunred Biological Technology Co.; stężenie grup karbonylowych białek – zbadano testem immunoenzymatycznym (ELISA) przy użyciu zestawów firmy Cell Biolabs Inc.; stężenie MG oraz CEL – oceniono kompetycyjnym testem immunoenzymatycznym (competitive ELISA) przy użyciu zestawów firmy Cell Biolabs Inc.; stężenie grup karbamylowych białek – oceniono testem immunoenzymatycznym podwójnego wiązania (sandwich ELISA) przy użyciu zestawów firmy Cell Biolabs Inc.; stężenie sRAGE – zbadano testem immunoenzymatycznym (Quantikine ELISA) przy użyciu zestawów R&D Systems.

### 3.3. ANALIZA STATYSTYCZNA

Obliczenia statystyczne zostały przeprowadzone, przy użyciu programu komputerowego „R”, we współpracy z Instytutem Informatyki Politechniki Poznańskiej.

Analizowane dane przedstawiono w postaci średnich wartości wraz z odchyleniem standardowym (średnia  $\pm$  odchylenie standardowe), a zmienne, których rozkład nie był zgodny z rozkładem normalnym, zaprezentowano w postaci mediany. W pracy przyjęto poziom istotności statystycznej  $p < 0,05$ .

Analizy porównawcze pomiędzy grupami wykonano w podziale na 5 grup (ZDR, eS-N, PRE, DO, HD). Dla zmiennych ilościowych przeprowadzono ocenę zgodności z rozkładem normalnym przy wykorzystaniu testu Shapiro-Wilka.

Przy założeniu braku zgodności z rozkładem normalnym ( $p < 0,05$ ) do analizy porównawczej zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa. Wykorzystując test Wilcoxon, uzyskano informacje, które pary grup są istotnie statystycznie różne. Wykonano również analizę porównawczą każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami, aby dokonać interpretacji w porównaniu do wszystkich analizowanych grup. Natomiast dla zmiennych jakościowych wykonano test  $\chi^2$ .

Ponadto wykonano analizę korelacji pomiędzy wybranymi wykładnikami stresu oksydacyjnego a poszczególnymi parametrami laboratoryjnymi. Przed przystąpieniem do analizy korelacji dla wszystkich parametrów wykonano test zgodności z rozkładem normalnym oraz przeprowadzono ocenę zależności liniowej. Dla potwierdzenia założeń i obliczenia wartości  $p$  wykorzystano test Shapiro-Wilka. Dla wszystkich wykładników stresu oksydacyjnego i wszystkich parametrów laboratoryjnych wykonano test korelacji Pearsona i Spearmana. Powyższe wyniki zostały wykorzystane do analizy korelacji, gdzie dla zmiennych wykazujących zależności liniowe ( $p < 0,05$  dla testu Pearsona) i jednocześnie zgodnych z rozkładem normalnym ( $p > 0,05$  dla testu Shapiro-Wilka) wykorzystano współczynnik korelacji liniowej Pearsona. Natomiast dla zmiennych o charakterze niezgodnym z powyższymi założeniami (brak zależności liniowej lub brak zgodności z rozkładem normalnym) wykorzystano nieparametryczny odpowiednik korelacji Pearsona, czyli współczynnik korelacji Spearmana. W przypadku testu korelacji Pearsona i Spearmana, przy  $p < 0,05$ , współczynnik korelacji  $r$  interpretowano następująco:

- $r > 0$  – korelacja dodatnia
- $r = 0$  – brak korelacji



- $r < 0$  – korelacja ujemna

Siłę korelacji interpretowano zgodnie z poniższymi przedziałami:

- $-1 < r < -0,7$  – bardzo silna korelacja ujemna
- $-0,7 < r < -0,5$  – silna korelacja ujemna
- $-0,5 < r < -0,3$  – korelacja ujemna o umiarkowanym natężeniu
- $-0,3 < r < -0,2$  – słaba korelacja ujemna
- $-0,2 < r < 0,2$  – brak korelacji
- $0,2 < r < 0,3$  – słaba korelacja dodatnia
- $0,3 < r < 0,5$  – korelacja dodatnia o umiarkowanym natężeniu
- $0,5 < r < 0,7$  – silna korelacja dodatnia
- $0,7 < r < 1$  – bardzo silna korelacja dodatnia

#### 4. WYNIKI

##### 4.1. OCENA PARAMETRÓW LABORATORYJNYCH W POSZCZEGÓLNYCH GRUPACH

Wyniki stężeń poszczególnych parametrów laboratoryjnych w grupie badanej, z uwzględnieniem podziału na pięć głównych grup zostały przedstawione w tabeli 2 (Tabela 2).

Tabela 2. Charakterystyka grup pod względem oceny parametrów laboratoryjnych.

	Grupa badanych (n=195)					p*
	ZDR (n=32)	eS-N (n=37)	PChN (n=126)			
			PChN G3b-G4	SNN		
				PRE (n=48)	DO (n=35)	
<b>Morfologia krwi obwodowej</b>						
HGB [g/dl]	13,91 ± 0,86	13,77 ± 1,23	11,06 ± 1,11	11,50 ± 1,70	10,84 ± 1,21	0,00
RBC [ $10^{12}/l$ ]	4,73 ± 0,48	4,29 ± 0,80	3,64 ± 0,61	3,68 ± 0,54	3,42 ± 0,46	0,00
HCT [l/l]	43,67 ± 2,75	40,55 ± 3,77	32,11 ± 2,98	33,06 ± 4,40	32,35 ± 3,31	0,00
WBC [ $10^9/l$ ]	5,45 ± 0,98	6,38 ± 1,65	6,71 ± 2,24	7,78 ± 2,78	6,54 ± 1,59	0,00
PLT [ $10^9/l$ ]	313,72 ± 73,69	210,43 ± 39,84	219,67 ± 73,03	242,83 ± 97,68	183,79 ± 64,51	0,00
<b>Parametry wydolności nerek</b>						
mocznik [mg/dl]	27,80 ± 8,77	42,61 ± 13,43	98,17 ± 23,75	97,46 ± 28,54	92,91 ± 42,30	0,00
kreatynina [mg/dl]	0,62 ± 0,11	0,85 ± 0,17	2,58 ± 0,99	7,16 ± 2,67	7,95 ± 2,69	0,00
eGFR [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	111,75 ± 24,07	96,22 ± 22,44	23,73 ± 8,76	7,66 ± 3,05	7,60 ± 3,14	0,00
<b>Parametry biochemiczne</b>						
sód [mmol/l]	138,59	137,73	140,85	137,23	138,07	0,00

	Grupa badanych (n=195)					p*
	ZDR (n=32)	eS-N (n=37)	PChN (n=126)			
			PChN G3b-G4	SNN		
			PRE (n=48)	DO (n=35)	HD (n=43)	
	± 2,92	± 3,84	± 3,18	± 3,69	± 2,92	
potas [mmol/l]	4,00 ± 0,42	5,69 ± 1,32	4,80 ± 0,57	4,54 ± 0,65	4,89 ± 0,70	0,00
glukoza [mg/dl]	79,27 ± 10,54	87,92 ± 6,78	83,46 ± 9,26	82,34 ± 9,88	78,72 ± 9,47	0,00
kwas moczowy [mg/dl]	5,88 ± 1,31	5,32 ± 1,03	6,99 ± 1,69	5,81 ± 1,29	6,24 ± 1,42	0,00
białko całkowite [g/dl]	6,81 ± 0,49	6,71 ± 0,43	6,75 ± 0,42	6,56 ± 0,45	6,46 ± 0,27	0,00
albumina [g/dl]	4,36 ± 0,31	4,29 ± 0,28	4,32 ± 0,27	4,20 ± 0,29	4,13 ± 0,17	0,00
AST [U/l]	18,00	18,00	17,50	15,00	18,00	ns
ALT [U/l]	17,00	17,00	17,00	17,00	18,00	ns
fosfataza zasadowa [U/l]	73,10	76,80	82,00	73,00	72,00	ns
Gospodarka wapniowo-fosforanowa						
wapń całkowity [mg/dl]	8,78 ± 0,56	8,57 ± 0,46	9,34 ± 0,71	9,73 ± 1,95	9,09 ± 0,59	0,00
wapń zjonizowany [mg/dl]	4,38 ± 0,30	4,32 ± 0,26	4,67 ± 0,36	4,98 ± 0,95	4,54 ± 0,29	0,00
PO <sub>4</sub> [mg/dl]	3,42 ± 0,49	3,54 ± 0,47	4,78 ± 0,98	4,49 ± 0,57	7,33 ± 3,16	0,00
PTH [pg/ml]	38,51 ± 10,51	41,92 ± 8,95	152,20 ± 144,86	321,30 ± 138,55	416,82 ± 322,86	0,00
FGF-23 [pg/ml]	428,41 ± 157,91	634,56 ± 134,03	704,70 ± 202,08	756,00 ± 218,22	803,45 ± 220,62	0,00

	Grupa badanych (n=195)					p*
	ZDR (n=32)	eS-N (n=37)	PChN (n=126)			
			PChN G3b-G4	SNN		
			PRE (n=48)	DO (n=35)	HD (n=43)	
klotho [ng/ml]	8,77 ± 4,61	5,20 ± 4,16	3,35 ± 2,44	4,75 ± 3,81	6,04 ± 3,03	0,00
Stan zapalny						
hsCRP [mg/l]	2,04 ± 1,44	5,26 ± 3,44	7,92 ± 4,09	5,74 ± 3,72	10,69 ± 2,60	0,00
Gospodarka żelazowa						
żelazo [µg/dl]	111,03 ± 20,44	113,03 ± 22,57	83,60 ± 27,46	78,97 ± 29,84	87,79 ± 38,60	0,00
UIBC [µg/dl]	197,97 ± 25,25	197,84 ± 26,17	185,98 ± 70,30	164,89 ± 45,10	95,21 ± 72,41	0,00
TIBC [µg/dl]	309,94 ± 41,27	310,86 ± 43,86	272,67 ± 65,54	247,29 ± 44,19	179,72 ± 69,77	0,00
ferrytyna [ng/ml]	106,64 ± 40,75	115,00 ± 46,37	387,08 ± 387,90	372,63 ± 180,15	1204,44 ± 902,61	0,00
Gospodarka lipidowa						
cholesterol całkowity [mg/dl]	176,75 ± 23,06	191,16 ± 45,95	198,06 ± 46,84	189,03 ± 36,71	163,30 ± 49,66	0,02
HDL-C [mg/dl]	68,97 ± 6,46	44,97 ± 9,09	45,54 ± 19,21	55,20 ± 19,69	45,21 ± 23,57	0,00
LDL-C [mg/l]	87,60 ± 24,66	104,59 ± 45,10	122,63 ± 42,07	94,78 ± 39,50	92,32 ± 44,46	0,00
TG [mg/dl]	105,71 ± 35,57	138,82 ± 72,27	144,38 ± 36,99	147,91 ± 47,05	127,53 ± 44,17	0,00

Dane przedstawiono w postaci średnich wartości wraz z odchyleniem standardowym (średnia ± odchylenie standardowe), a dla zmiennych, których rozkład nie był zgodny z rozkładem normalnym przedstawiono medianę)

\* Analizy porównawcze dla zmiennych o charakterze ilościowym wykonano nieparametrycznym testem Kruskala-Wallisa, analizy porównawcze dla zmiennych o charakterze jakościowym wykonano test  $\chi^2$ . Wartość p została zaokrąglona do części setnych, jeśli różnice pomiędzy grupami były istotne

statystycznie ( $p < 0,05$ ). W przypadku, gdy nie wykazano istotnie statystycznych różnic pomiędzy grupami ( $p > 0,05$ ) wprowadzono oznaczenie „ns”.

#### 4.2. OCENA STĘŻENIA WYKŁADNIKÓW WYBRANYCH MODYFIKACJI BIAŁEK I ICH KORELACJI Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI OCENIANYMI W POSZCZEGÓLNYCH GRUPACH

Wyniki stężeń poszczególnych wykładników modyfikacji białkowych w grupie badanej, z uwzględnieniem podziału na pięć głównych grup, zostały przedstawione w Tabeli 3. (Tabela 3).

Tabela 3. Stężenia ocenianych modyfikacji białkowych w badanej grupie, z uwzględnieniem podziału na pięć głównych grup.

	Grupa badanych (n=195)					p*
	ZDR (n=32)	eS-N (n=37)	PChN (n=126)			
			PChN G3b-G4	SNN		
			PRE (n=48)	DO (n=35)	HD (n=43)	
Oceniane modyfikacje białkowe						
CML [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka]	0,005 $\pm 0,001$	0,01 $\pm 0,01$	0,01 $\pm 0,01$	0,01 $\pm 0,01$	0,02 $\pm 0,01$	0,00
CEL [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka]	0,05 $\pm 0,02$	0,07 $\pm 0,07$	0,16 $\pm 0,15$	0,67 $\pm 0,44$	0,39 $\pm 0,40$	0,00
MG [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka]	0,03 $\pm 0,01$	0,06 $\pm 0,03$	0,11 $\pm 0,07$	0,24 $\pm 0,15$	0,17 $\pm 0,10$	0,00
AGE [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka]	28,38 $\pm 34,74$	27,88 $\pm 8,93$	28,57 $\pm 18,59$	37,38 $\pm 21,22$	46,92 $\pm 25,70$	0,00
RAGE [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka]	0,04 $\pm 0,02$	0,04 $\pm 0,01$	0,04 $\pm 0,02$	0,06 $\pm 0,01$	0,05 $\pm 0,02$	0,00
3-NT [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ białka]	3,81 $\pm 1,82$	11,00 $\pm 5,57$	10,91 $\pm 9,57$	12,94 $\pm 8,10$	17,86 $\pm 12,06$	0,00
AOPP [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ białka]	0,77	1,15	1,13	1,59	1,84	0,00

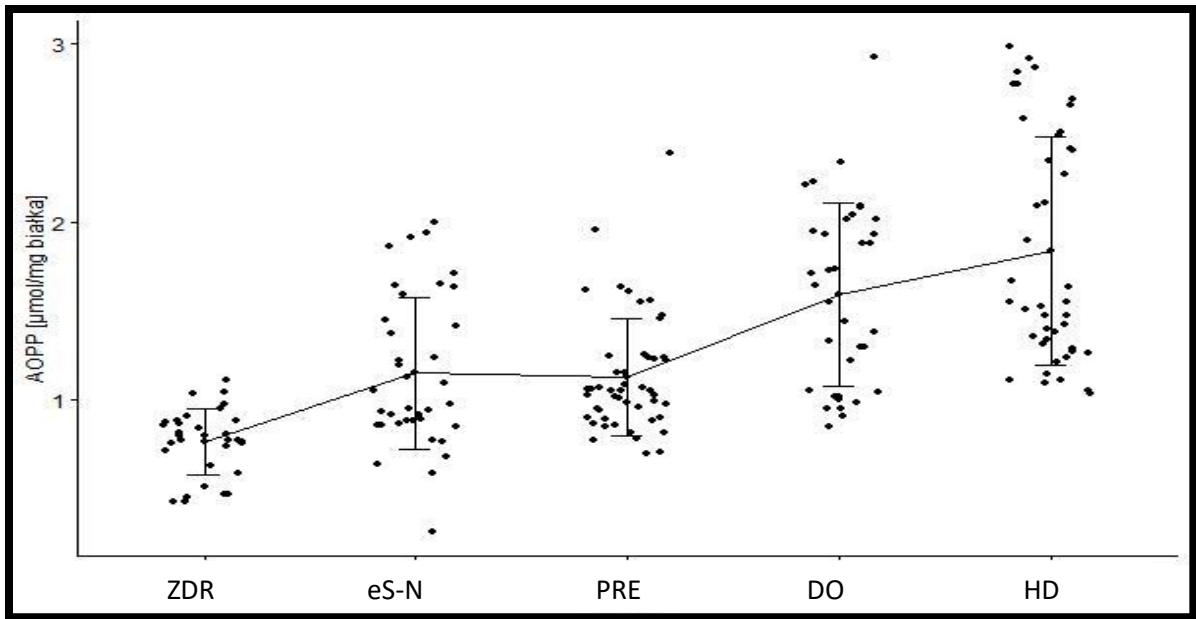
	Grupa badanych (n=195)					p*
	ZDR (n=32)	eS-N (n=37)	PChN (n=126)			
			PChN G3b-G4	SNN		
			PRE (n=48)	DO (n=35)	HD (n=43)	
	± 0,18	± 0,43	± 0,33	± 0,51	± 0,64	
grupy karbonylowe białek [nmol/mg białka]	3,12 ± 0,80	4,56 ± 0,99	5,07 ± 1,64	5,83 ± 1,44	7,77 ± 1,41	0,00
grupy karbamylowe białek [μg/mg białka]	0,92 ± 0,99	0,23 ± 0,33	0,15 ± 0,18	0,29 ± 0,49	0,18 ± 0,27	0,00

Dane przedstawiono w postaci średnich wartości wraz z odchyleniem standardowym (średnia ± odchylenie standardowe). \* Analizy porównawcze dla zmiennych o charakterze ilościowym wykonano nieparametrycznym testem Kruskala-Wallis. Wartość p została zaokrąglona do części setnych, jeśli różnice pomiędzy grupami były istotne statystycznie (p < 0,05).

#### 4.2.1. OCENA STĘŻENIA AOPPs i KORELACJE STĘŻENIA AOPPs Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI

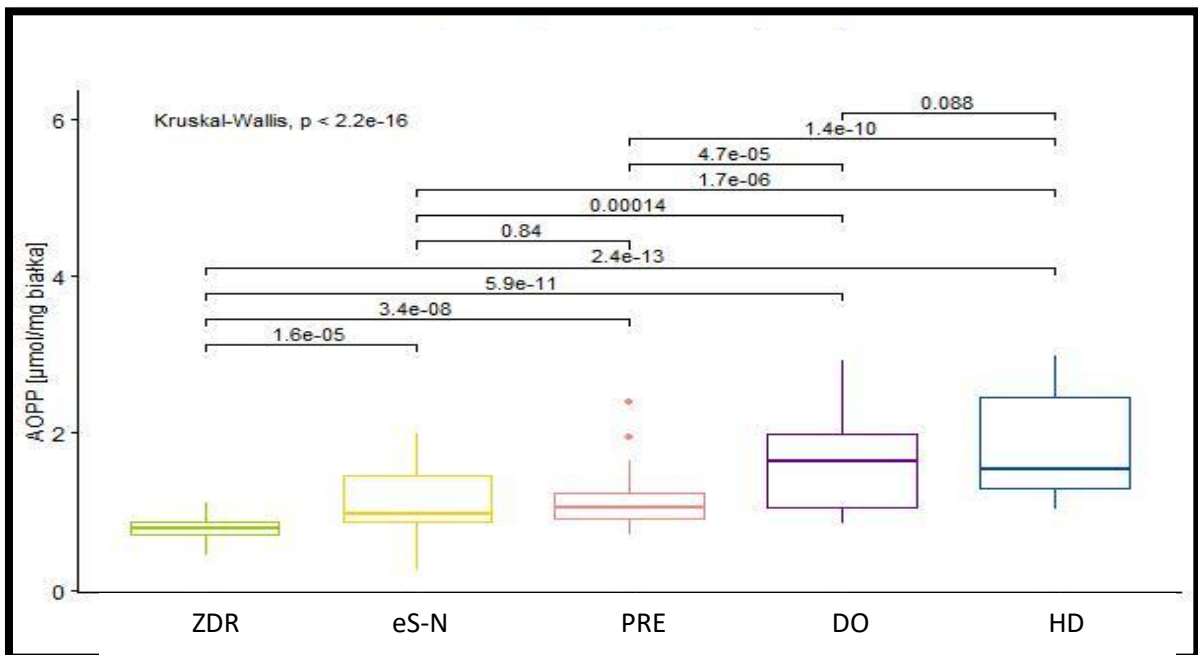
Średnie stężenie AOPPs było najniższe w grupie ZDR. W grupie eS-N średnie stężenie AOPPs wzrastało, ale nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w porównaniu z grupą ZDR. W grupie NEFRO zaobserwowano wzrost średniego stężenia AOPPs wraz ze spadkiem wydolności nerek: średnie stężenie w grupie PRE było znacząco niższe niż w grupach DO i HD. Najwyższe średnie stężenie AOPPs dotyczyło grupy HD. Grupy ZDR, DO i HD odróżniały się istotnie w porównaniu do pozostałych grup. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą DO a HD.

Rozkład zmian stężenia AOPPs w poszczególnych grupach przedstawiono na rycinie 16 (Ryc. 16).

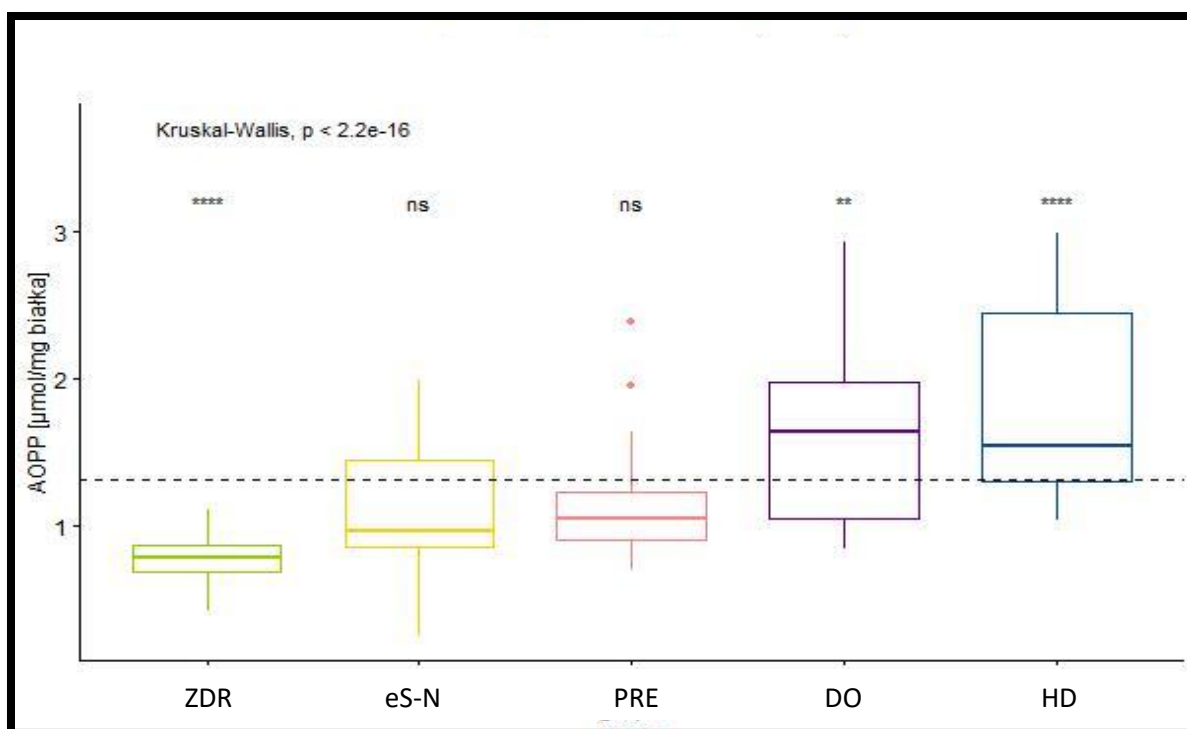


Ryc. 16. Porównanie stężenia AOPPs dla 5 grup badanych.

Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu AOPPs przedstawiono na rycinach 17-18 (Ryc. 17-18) i dla ułatwienia analizy w tabeli 4 (Tabela 4).



Ryc. 17. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu AOPPs.



Ryc. 18. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu AOPPs, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami. W przypadku, gdy nie wykazano istotnie statystycznych różnic ( $p > 0,05$ ) wprowadzono oznaczenie „ns”.

Tabela 4. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu AOPPs.

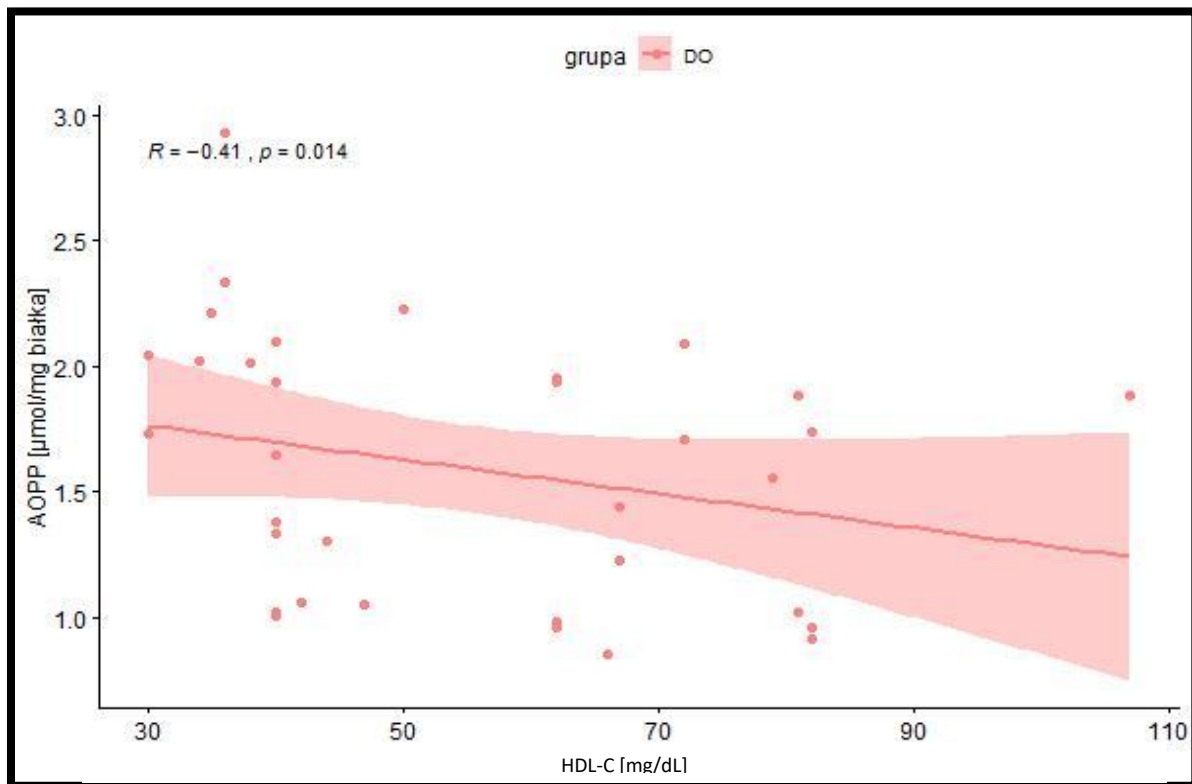
AOPPs [µmol/mg białka]	ZDR	eS-N	PRE	DO	HD
ZDR		ns	<0,05	<0,05	<0,05
eS-N	ns		ns	<0,05	<0,05
PRE	<0,05	ns		<0,05	<0,05
DO	<0,05	<0,05	<0,05		ns
HD	<0,05	<0,05	<0,05	ns	

Analizy porównawcze wykonano testem Kruskala-Wallisa. Wyróżniono wartość  $p$ , gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ . ns - oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami pod względem analizowanego parametru.

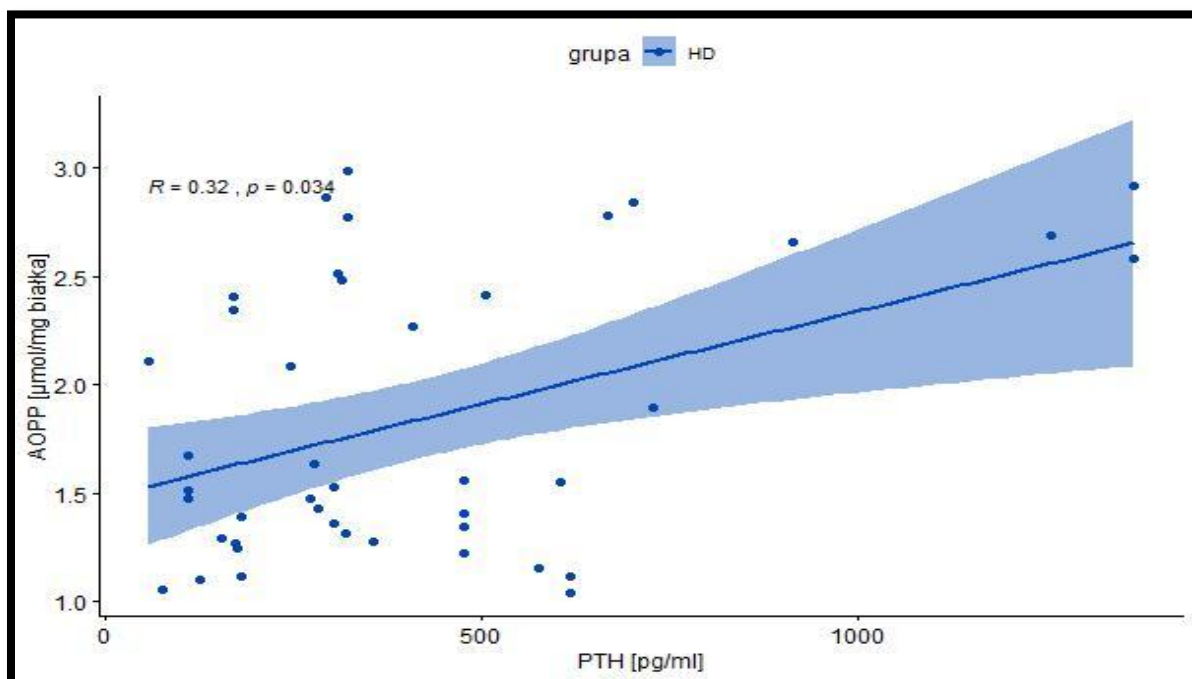
Analiza korelacji pomiędzy AOPPs a badanymi parametrami laboratoryjnymi pozwoliła na wykazanie następujących istotnych zależności: w grupie DO zaobserwowano ujemną korelację AOPPs ze stężeniem HDL-cholesterolu (HDL-C), a w grupie HD: dodatnią



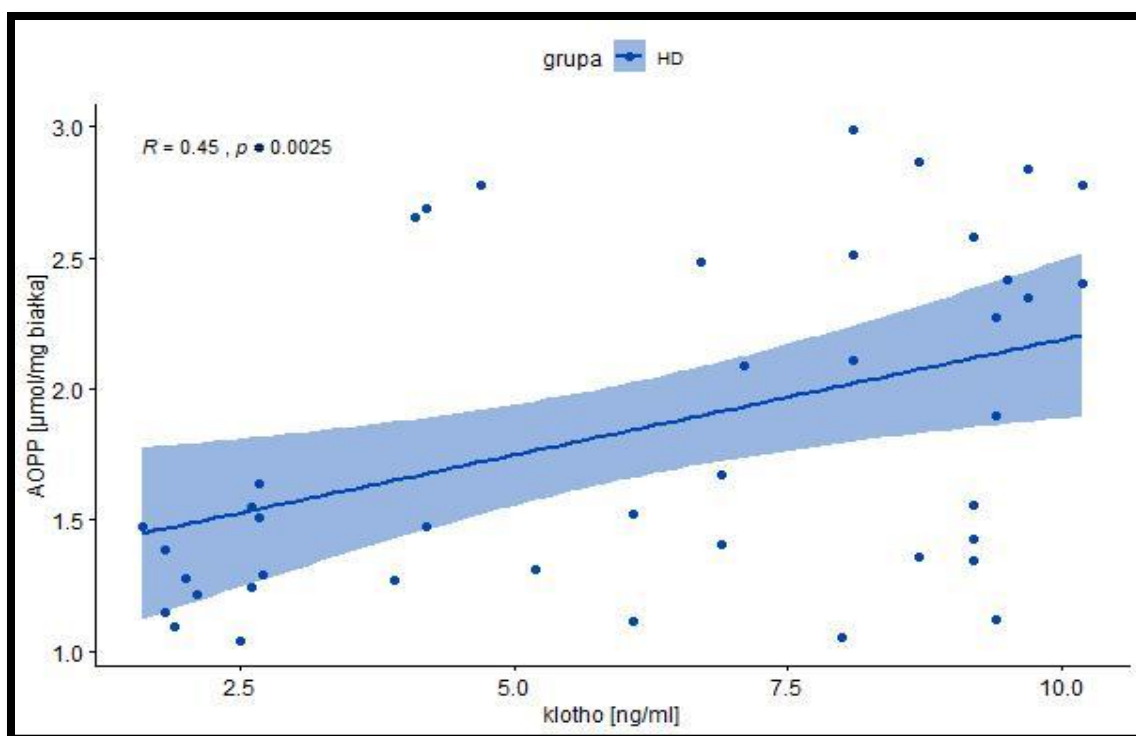
korelację ze stężeniem PTH i stężeniem białka Klotho. Zależności te przedstawiono na rycinach 25-29 (Ryc. 19-21).



Ryc. 19. Zależność pomiędzy stężeniem AOPPs a stężeniem HDL-cholesterolu (HDL-C) w grupie DO.



Ryc. 20. Zależność pomiędzy stężeniem AOPPs a stężeniem PTH w grupie HD.



Ryc. 21. Zależność pomiędzy stężeniem AOPPs a stężeniem białka Klotho w grupie HD.

Z kolei w grupie PRE wykazano umiarkowaną dodatnią zależność AOPPs ze stężeniem trójglicerydów, ale grupa PRE pod względem stężenia AOPPs nie odróżniała się w sposób statystycznie istotny od wszystkich pozostałych grup.

Natomiast w grupie eS-N stężenie AOPPs wykazywało umiarkowaną ujemną zależność ze stężeniem białka całkowitego i albuminy.

Zależności pomiędzy stężeniem AOPPs a ocenianymi parametrami laboratoryjnymi, dla których zależności te były statystycznie istotne, przedstawiono w tabeli 5 (Tabela 5).

Tabela 5. Wyniki testu korelacji dla AOPPs i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności te okazały się być statystycznie istotne.

	Korelacje			
	r	p*	test korelacji	siła korelacji
	eS-N (n=37)			
białko całkowite [g/dl]	-0,4259989	0,008566387	Spearman	umiarkowana
albumina [g/dl]	-0,4259989	0,008566387	Spearman	umiarkowana

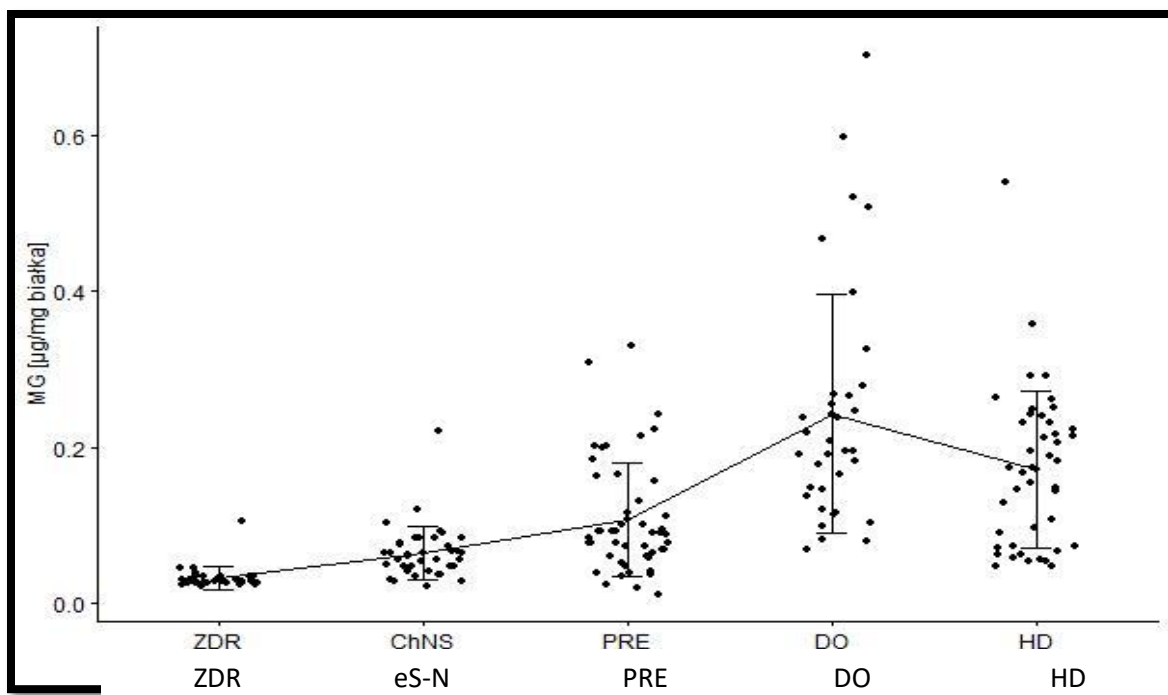
	Korelacje			
	r	p*	test korelacji	siła korelacji
TG [mg/dl]	PRE (n=48)			
	0,3005083	0,03795509	Spearman	umiarkowana
HDL-C [mg/dl]	DO (n=35)			
	-0,4131579	0,01363121	Spearman	umiarkowana
PTH [pg/ml]	HD (n=43)			
	0,3248225	0,03356631	Spearman	umiarkowana
klotho [ng/ml]	0,4493918	0,002502017	Spearman	umiarkowana

\*Wyróżniono wartość p, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ .

#### **4.2.2. OCENA STĘŻENIA MG, CEL, CML I AGEs ORAZ KORELACJE ICH STĘŻENIA Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI**

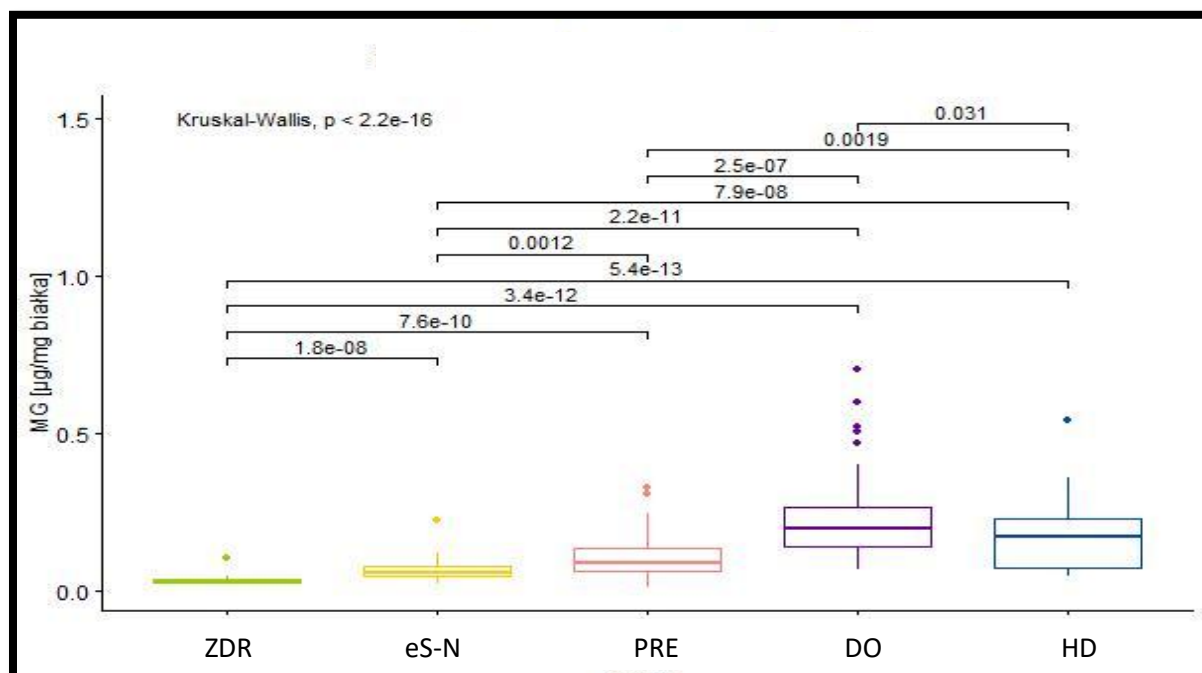
##### **4.2.2.1. MG**

Średnie stężenie MG było najniższe w grupie ZDR. Zaobserwowano stopniowy wzrost średniego stężenia MG w pozostałych grupach: poczynając od grupy eS-N, przez grupę PRE, następnie – grupę HD, a kończąc – na grupie DO. Grupa eS-N różniła się w sposób statystycznie istotny od grupy ZDR oraz od wszystkich pozostałych grup NEFRO. W ocenie całościowej każda z grup, za wyjątkiem grupy PRE, odróżniała się w sposób statystycznie istotny od wszystkich pozostałych grup łącznie. Rozkład stężenia MG przedstawiono na rycinie 22 (Ryc. 22).

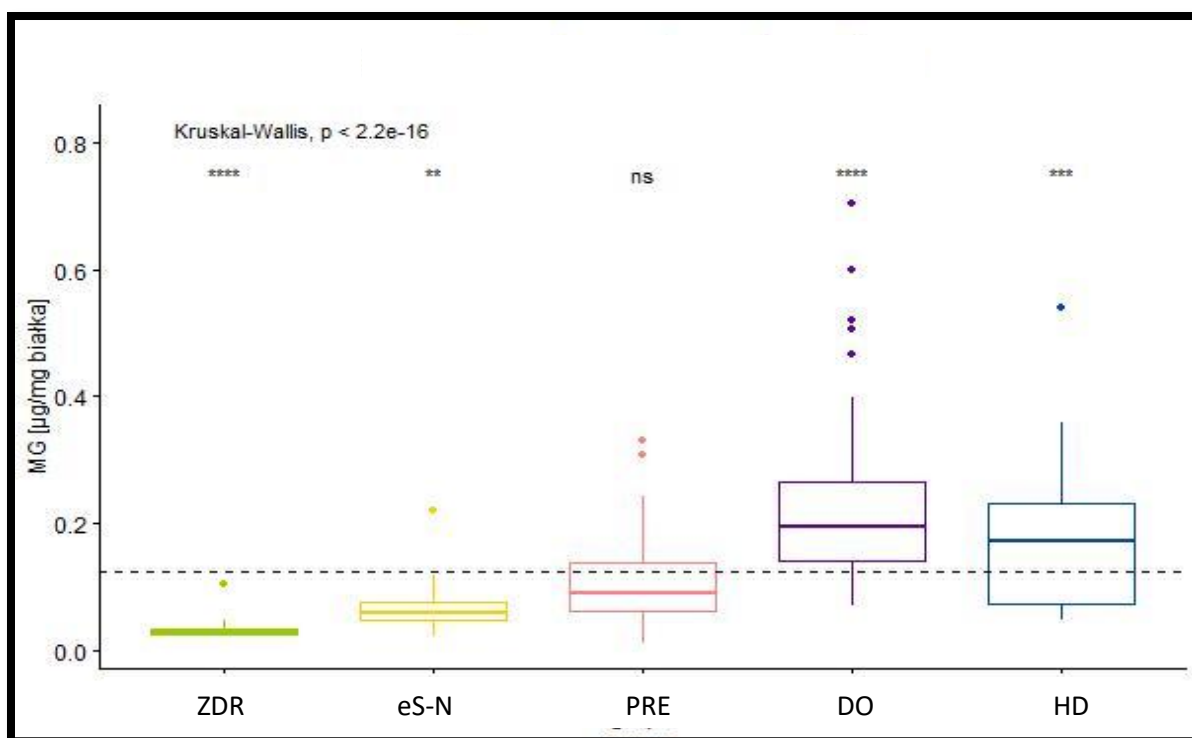


Ryc. 22. Porównanie stężenia MG dla 5 grup badanych.

Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu MG przedstawiono na rycinie 23-24 (Ryc. 23-24) i dla ułatwienia analizy w tabeli 6 (Tabela 6).



Ryc. 23. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu MG.



Ryc. 24. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu MG, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami. W przypadku, gdy nie wykazano istotnie statystycznych różnic ( $p > 0,05$ ) wprowadzono oznaczenie „ns”.

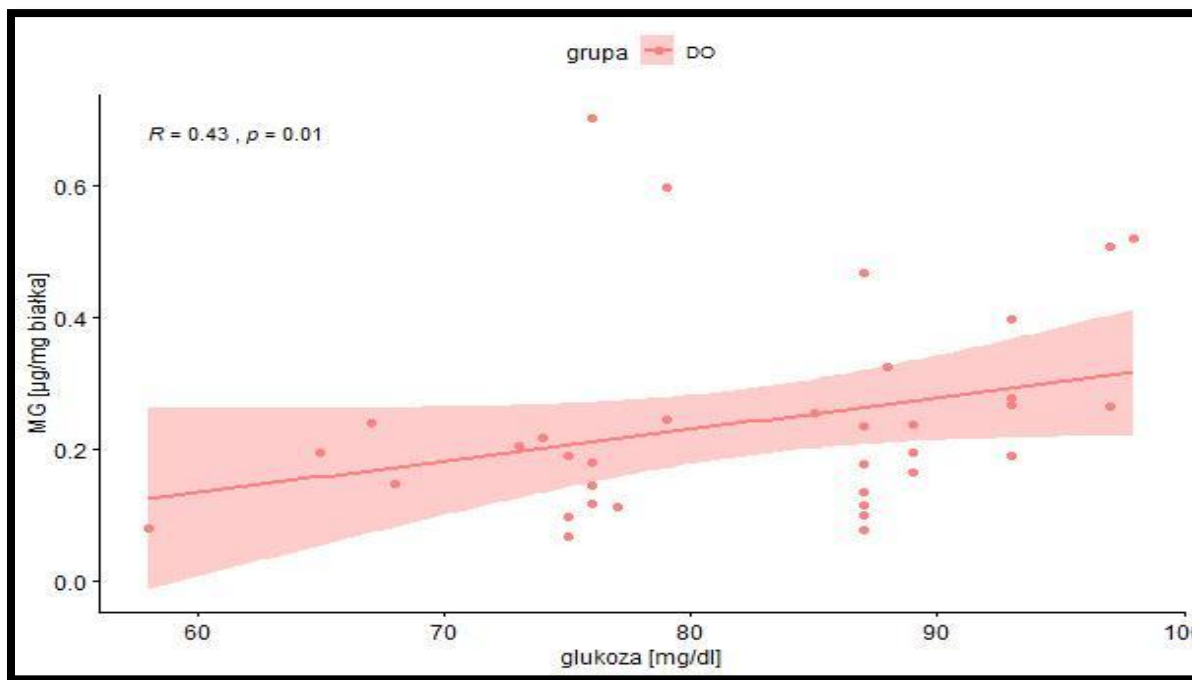
Tabela 6. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu MG.

MG [µg/mg białka]	ZDR	eS-N	PRE	DO	HD
ZDR		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
eS-N	<0,05		<0,05	<0,05	<0,05
PRE	<0,05	<0,05		<0,05	<0,05
DO	<0,05	<0,05	<0,05		<0,05
HD	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	

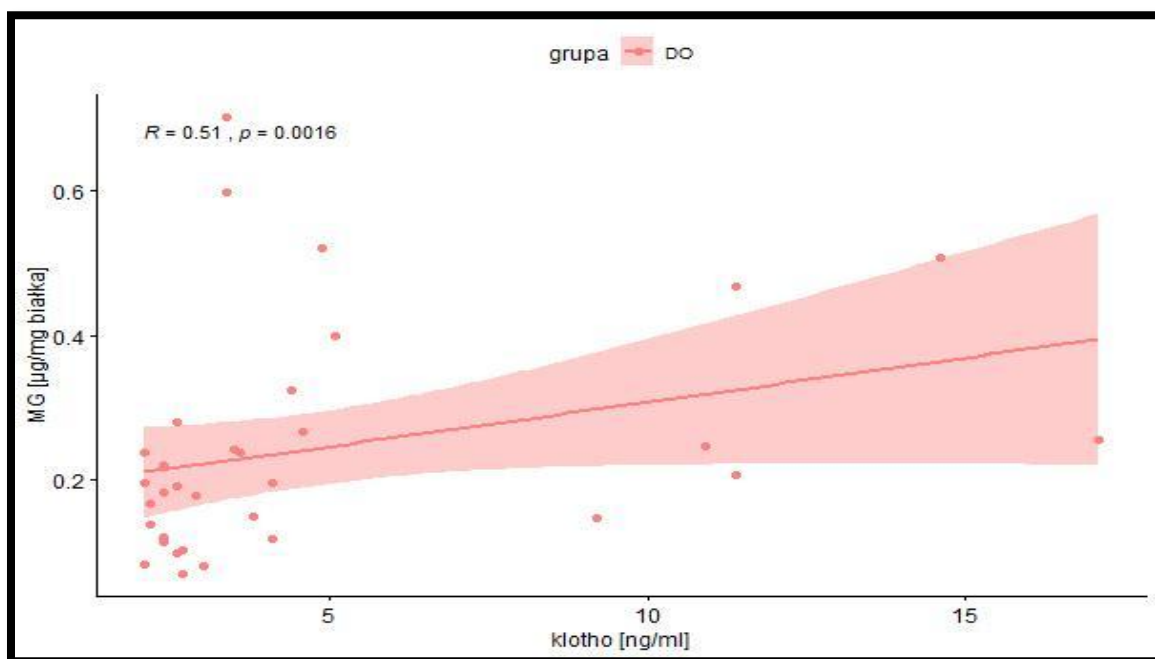
Analizy porównawcze wykonano testem Kruskala-Wallisa. Wyróżniono wartość  $p$ , gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ .

W przypadku oceny stężenia MG, w grupach odróżniających się w sposób istotny od pozostałych grup, zaobserwowano następujące zależności: w grupie DO – umiarkowaną

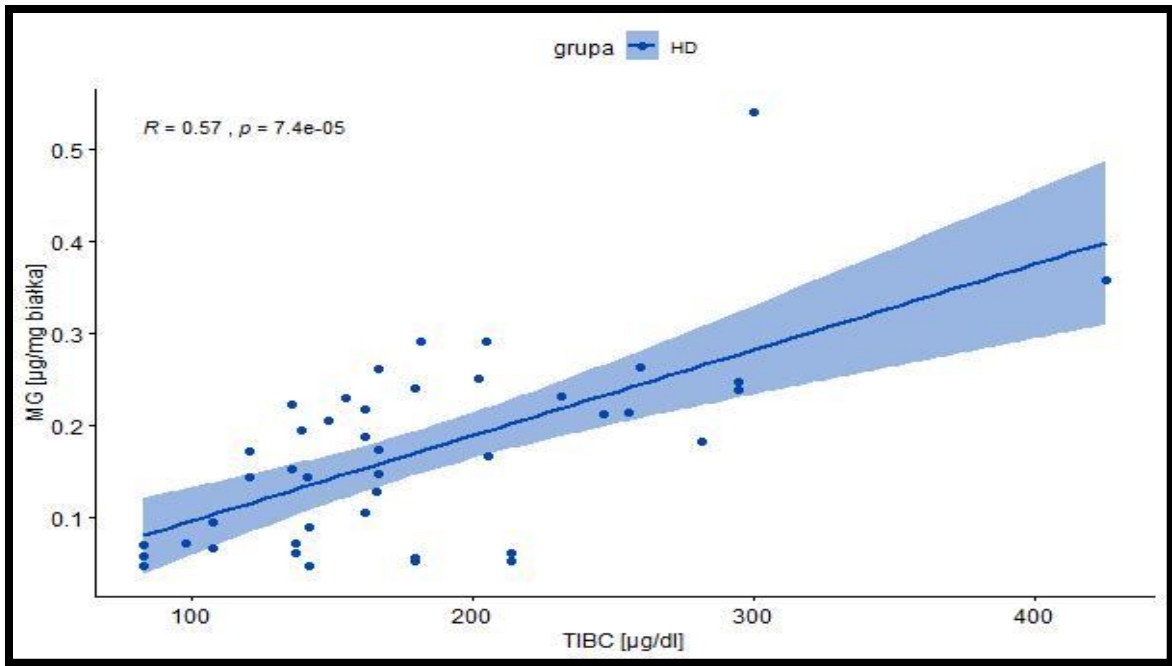
dotadnią korelację ze stężeniem glukozy oraz silną dodatnią korelację ze stężeniem białka Klotho. W grupie HD stężenie MG wykazywało zależność ze stężeniem kreatyniny i wartością eGFR oraz z parametrami gospodarki żelazowej (stężenie ferrytyny, wartość TIBC i UIBC). Z kolei w grupie eS-N nie stwierdzono istotnych zależności. Istotne zależności przedstawiono na rycinach 25-29 (Ryc. 25-29).



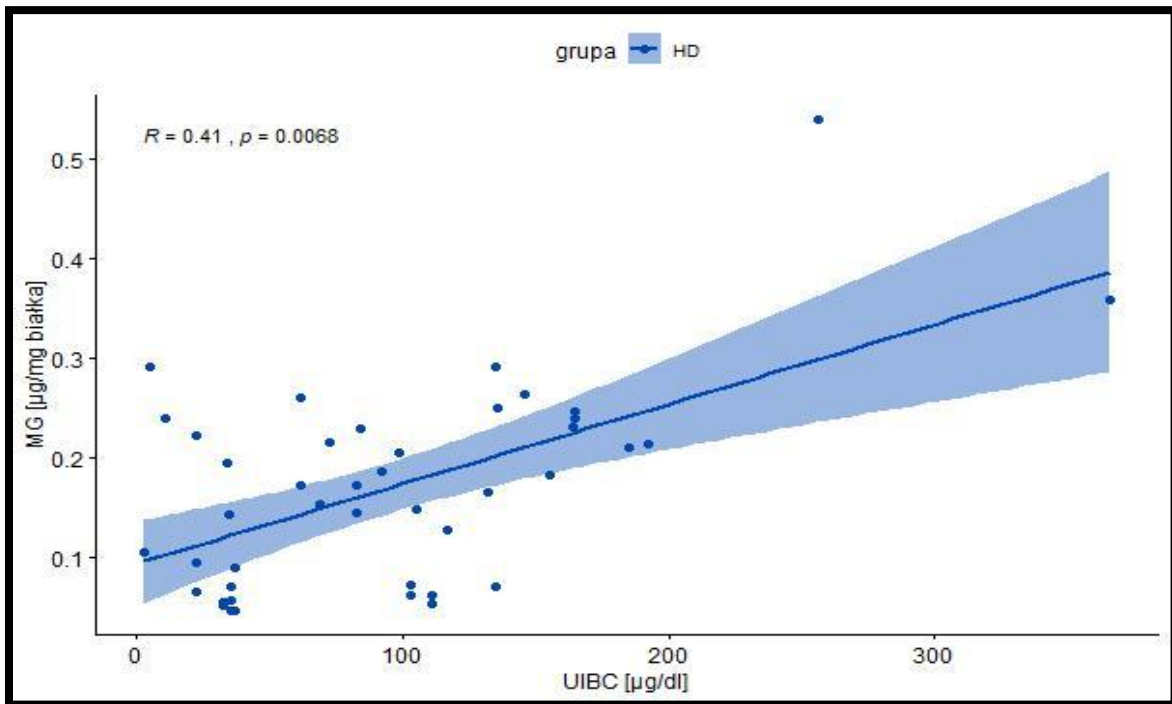
Ryc. 25. Zależność pomiędzy stężeniem MG a stężeniem glukozy w grupie DO.



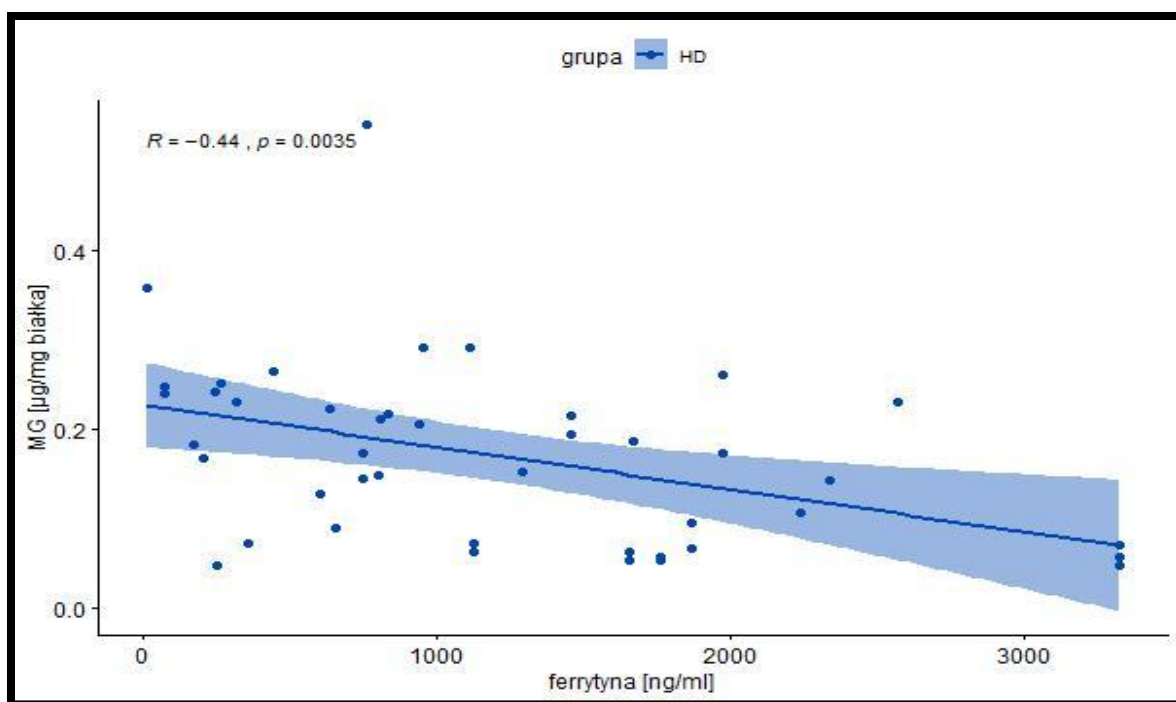
Ryc. 26. Zależność pomiędzy stężeniem MG a stężeniem białka Klotho w grupie DO.



Ryc. 27. Zależność pomiędzy stężeniem MG a wartością TIBC w grupie HD.



Ryc. 28. Zależność pomiędzy stężeniem MG a wartością UIBC w grupie HD.



Ryc. 29. Zależność pomiędzy stężeniem MG a stężeniem ferrytyny w grupie HD.

Zależności pomiędzy stężeniem MG a ocenianymi parametrami laboratoryjnymi, dla których zależności te były statystycznie istotne, przedstawiono w tabeli 7 (Tabela 7).

Tabela 7. Wyniki testu korelacji dla MG i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne.

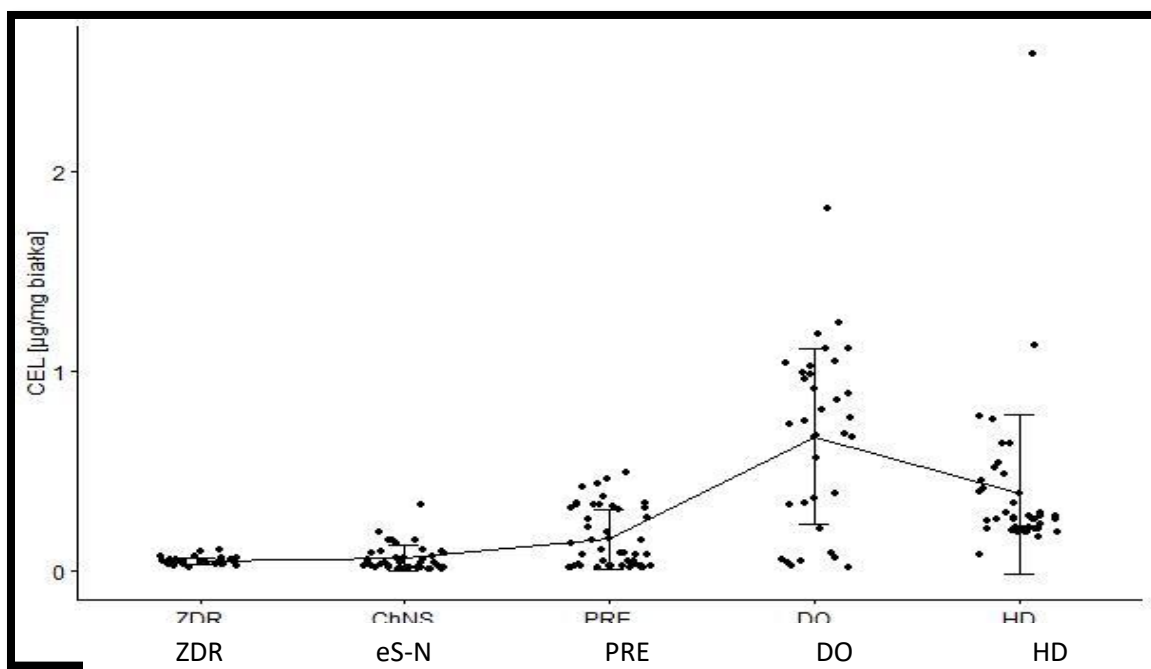
	Korelacje			
	r	p*	test korelacji	siła korelacji
	DO (n=35)			
glukoza [mg/dl]	0,4280761	0,01030631	Spearman	umiarkowana
klotho [ng/ml]	0,5146678	0,001560139	Spearman	silna
	HD (n=43)			
kreatynina [mg/dl]	0,7178104	6,04E-08	Spearman	bardzo silna
eGFR [ml/1,73m <sup>2</sup> /min]	-0,6599442	1,48E-06	Spearman	silna
UIBC [µg/dl]	0,406596	0,006817023	Spearman	umiarkowana
TIBC [µg/dl]	0,5670347	7,35E-05	Spearman	silna
ferrytyna [ng/ml]	-0,4355052	0,003512769	Spearman	umiarkowana

\*Wyróżniono wartość p, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ .



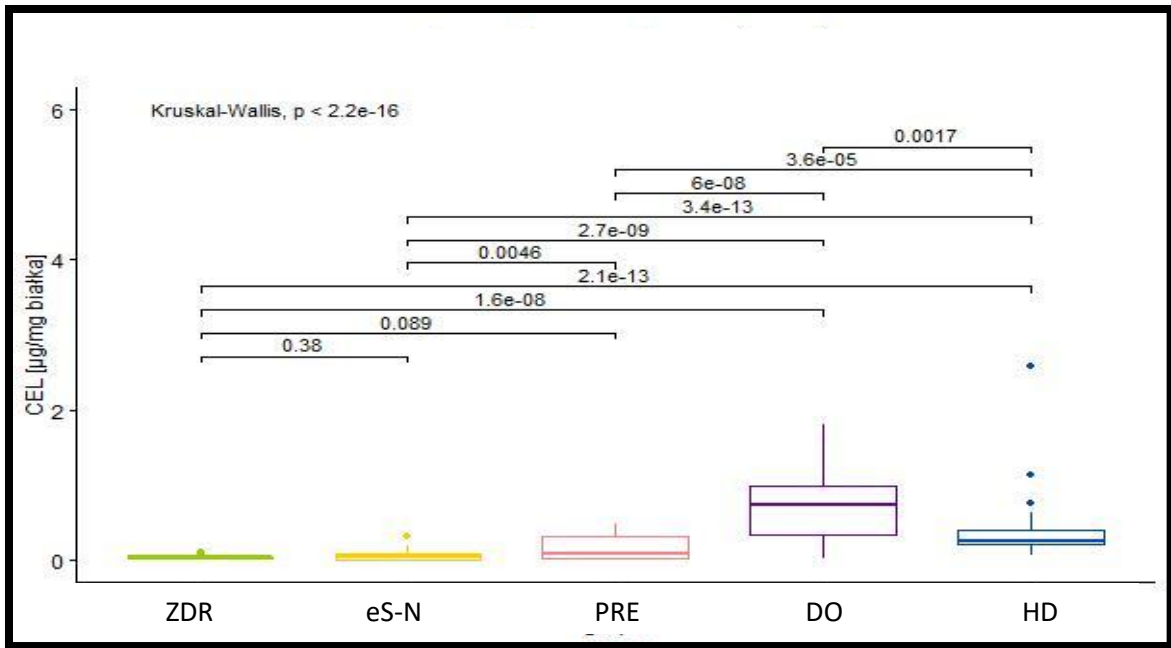
#### 4.2.2.2. CEL

Średnie stężenie CEL było najniższe w grupie ZDR. W pozostałych grupach średnie stężenie CEL wzrastało stopniowo: poczynając od grupy eS-N, przez grupę PRE, następnie – grupę HD, a kończąc – na grupie DO. Grupa eS-N nie różniła się w sposób statystycznie istotny od grupy ZDR. W ocenie całościowej każda z grup, za wyjątkiem grupy PRE, odróżniała się w sposób statystycznie istotny od wszystkich pozostałych grup łącznie. Rozkład stężenia CEL w badanych grupach przedstawiono na rycinie 30 (Ryc. 30).

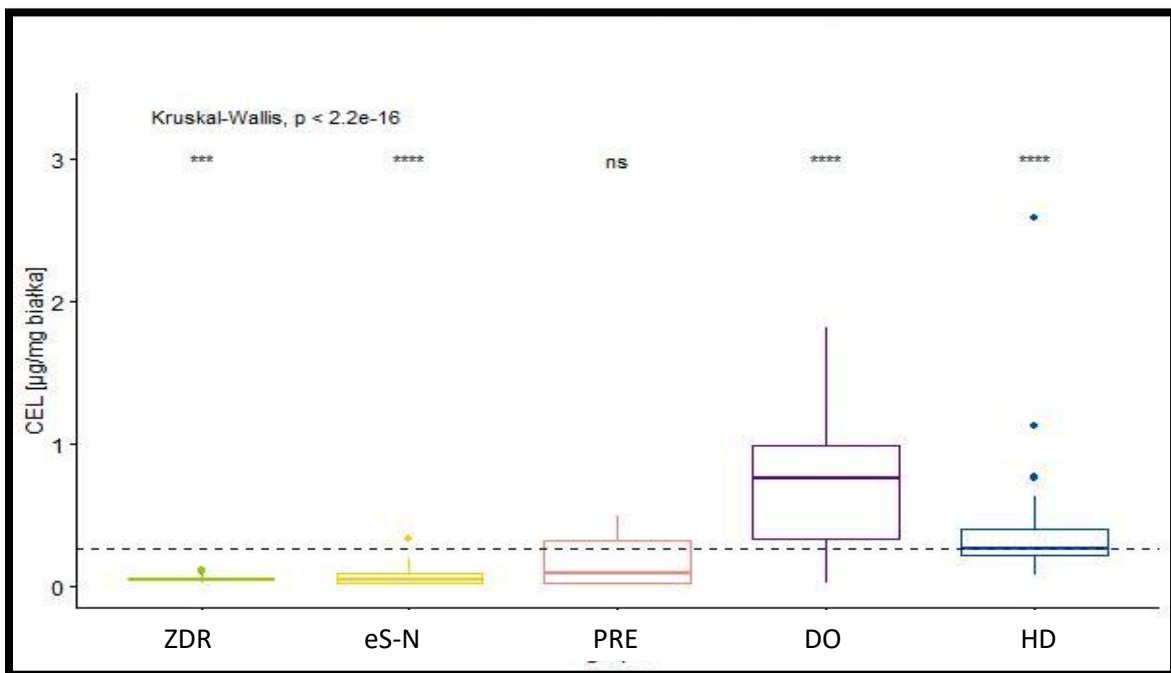


Ryc. 30. Porównanie stężenia CEL dla 5 grup badanych.

Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu CEL przedstawiono na rycinach 31-32 (Ryc. 31-32) i dla ułatwienia analizy w tabeli 8 (Tabela 8).



Ryc. 31. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu CEL.



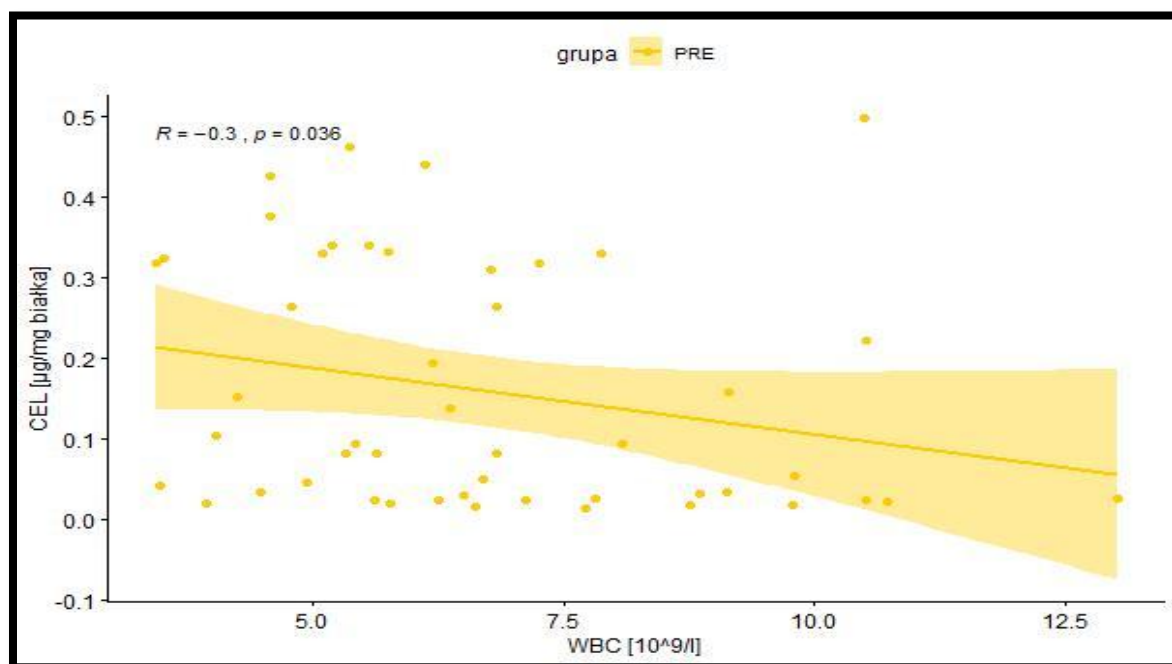
Ryc. 32. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu CEL, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami. W przypadku, gdy nie wykazano istotnie statystycznych różnic ( $p > 0,05$ ) wprowadzono oznaczenie „ns”.

Tabela 8. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu CEL.

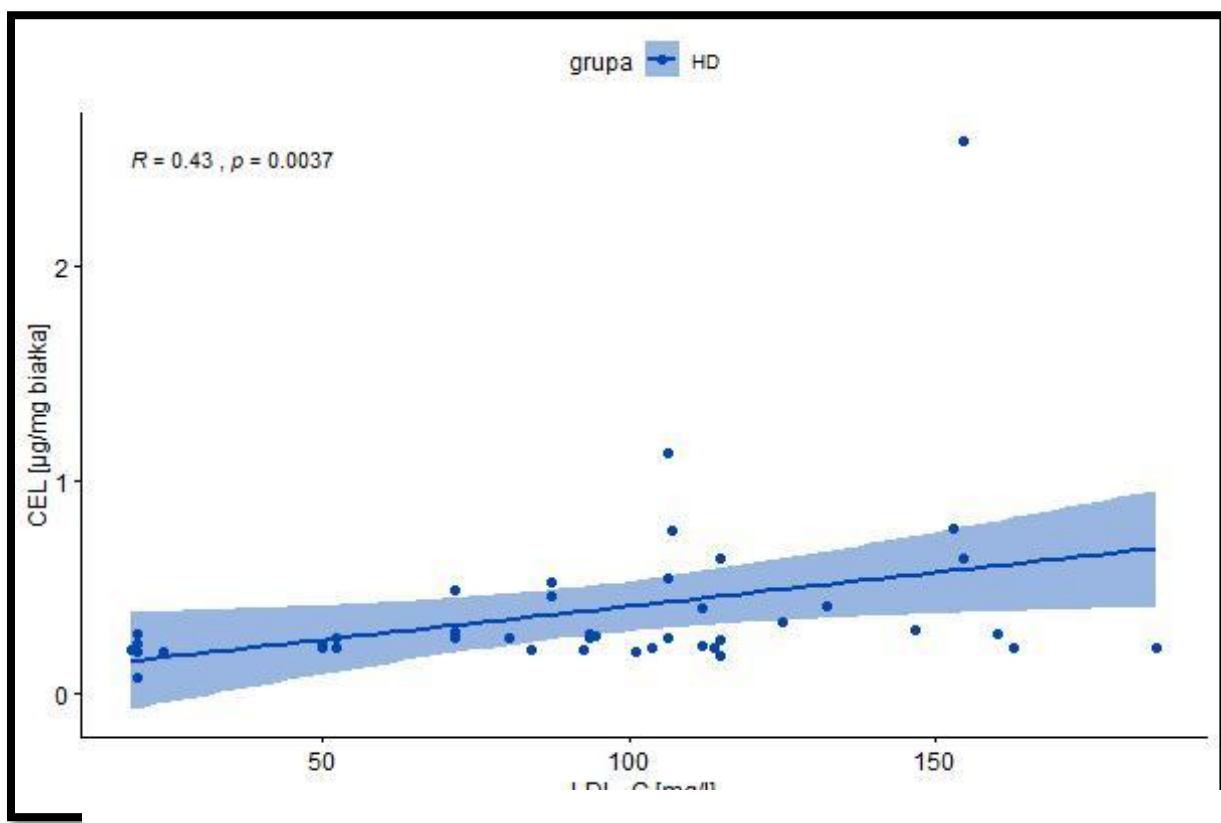
CEL [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka]	ZDR	eS-N	PRE	DO	HD
<b>ZDR</b>		ns	ns	<0,05	<0,05
<b>eS-N</b>	ns		<0,05	<0,05	<0,05
<b>PRE</b>	ns	<0,05		<0,05	<0,05
<b>DO</b>	<0,05	<0,05	<0,05		<0,05
<b>HD</b>	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	

Analizy porównawcze wykonano testem Kruskala-Wallisa. Wyróżniono wartość  $p$ , gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ . ns - oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami pod względem analizowanego parametru.

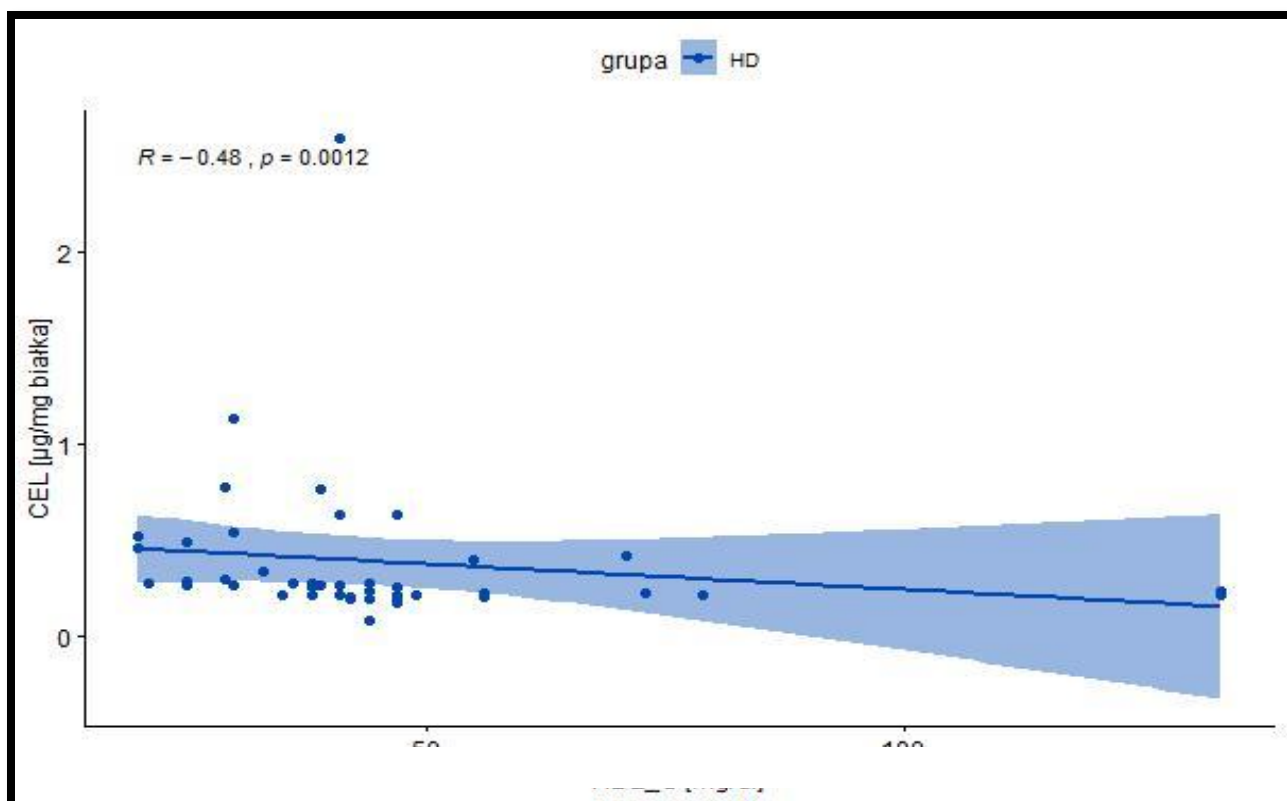
Analiza stężeń CEL wykazała w grupie PRE umiarkowaną ujemną zależność ze stężeniem białka całkowitego i albuminy oraz wartością WBC, a w grupie HD – umiarkowaną zależność z wartością RBC i HCT oraz ze stężeniem LDL-cholesterolu i HDL-cholesterolu. Zależności pomiędzy stężeniem CEL a wybranymi parametrami laboratoryjnymi przedstawiono na rycinach 33-35 (Ryc. 33-35).



Ryc. 33. Zależność pomiędzy stężeniem CEL a wartością WBC w grupie PRE.



Ryc.34. Zależność pomiędzy stężeniem CEL a stężeniem LDL-cholesterolu (LDL-C) w grupie HD.



Ryc.35. Zależność pomiędzy stężeniem CEL a stężeniem HDL-cholesterolu (HDL-C) w grupie HD.

Zależności pomiędzy stężeniem CEL a ocenianymi parametrami laboratoryjnymi, dla których zależności te były statystycznie istotne, przedstawiono w tabeli 9 (Tabela 9).

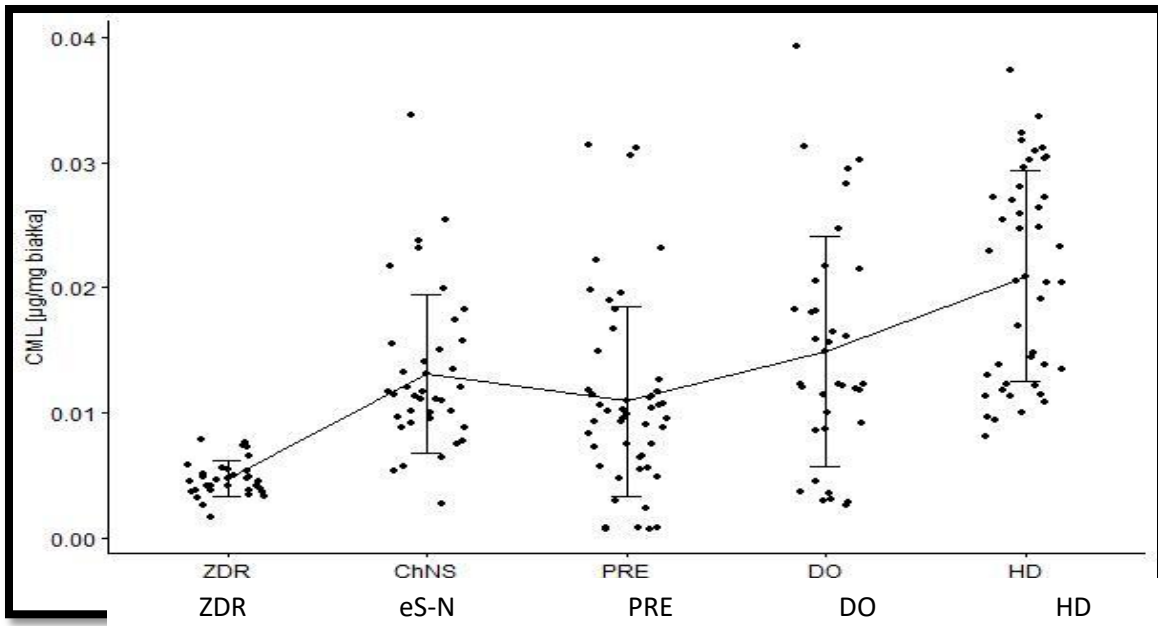
Tabela 9. Wyniki testu korelacji dla CEL i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne

	Korelacje			
	r	p*	test korelacji	siła korelacji
	PRE (n=48)			
WBC [ $10^9/l$ ]	-0,3036587	0,03588934	Spearman	umiarkowana
białko całkowite [g/dl]	-0,3571398	0,01270621	Spearman	umiarkowana
albumina [g/dl]	-0,3571398	0,01270621	Spearman	umiarkowana
	HD (n=43)			
RBC [ $10^{12}/l$ ]	0,3057385	0,04617267	Spearman	umiarkowana
HCT [l/l]	0,3034608	0,04790473	Spearman	umiarkowana
HDL-C [mg/dl]	-0,4766168	0,001233209	Spearman	umiarkowana
LDL-C [mg/l]	0,4334583	0,003688594	Spearman	umiarkowana

\*Wyróżniono wartość p, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ .

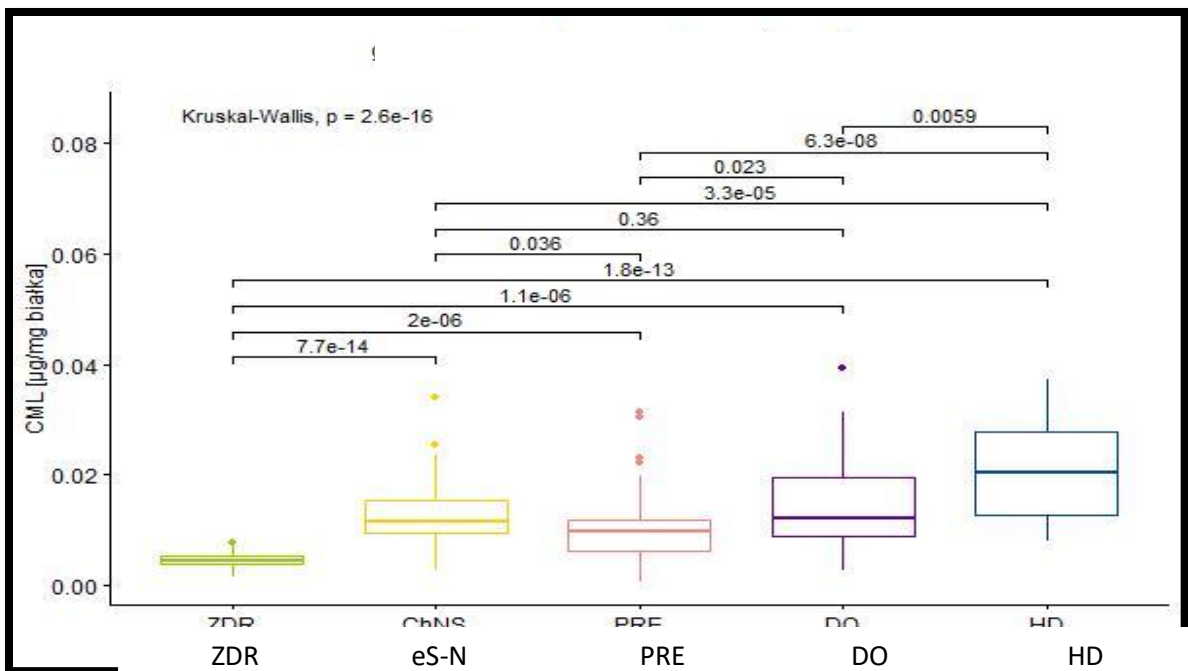
#### 4.2.2.3. CML

Średnie stężenie CML najniższe było w grupie ZDR, a najwyższe – w grupie HD. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami eS-N i DO. W ocenie całościowej jedynie grupy ZDR i HD odróżniały od pozostałych grup w sposób statystycznie istotny. Rozkład stężenia CML w badanych grupach przedstawiono na rycinie 36 (Ryc. 36).

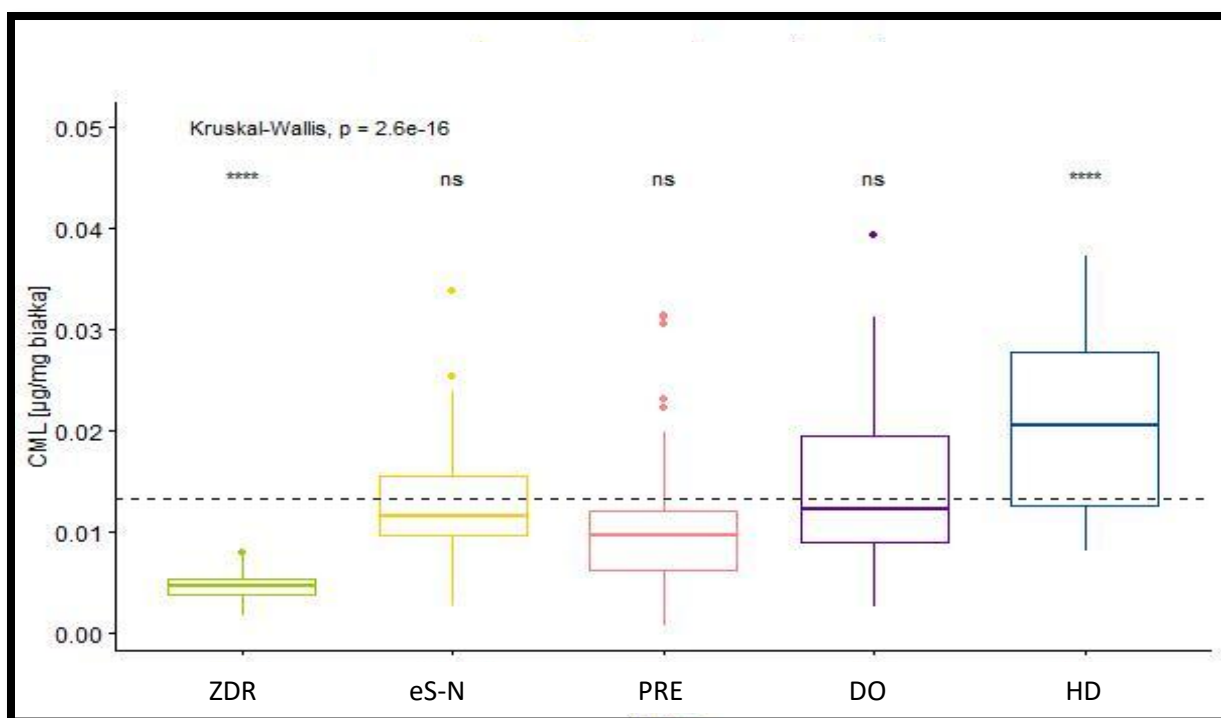


Ryc. 36. Porównanie stężenia CML dla 5 grup badanych.

Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu CML przedstawiono na rycinach 37-38 (Ryc. 37-38) i dla ułatwienia analizy w tabeli 10 (Tabela 10).



Ryc. 37. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu CML.



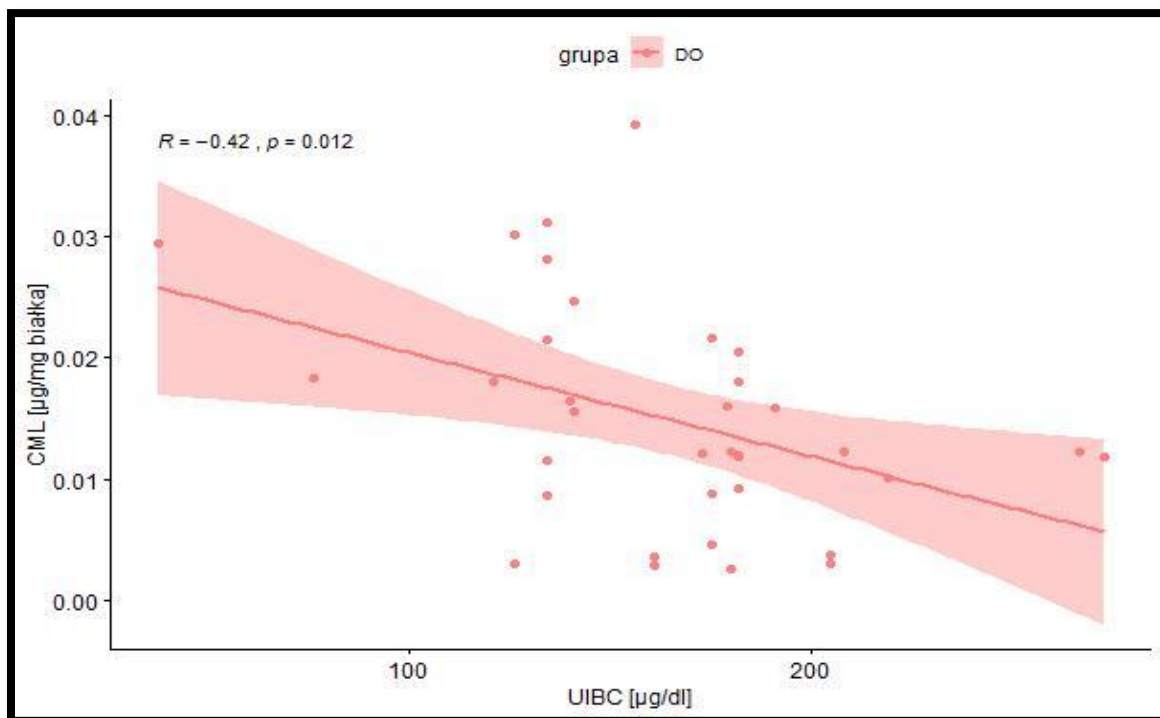
Ryc. 38. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu CML, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami. W przypadku, gdy nie wykazano istotnych statystycznych różnic ( $p > 0,05$ ) wprowadzono oznaczenie „ns”.

Tabela 10. Wyniki testu korelacji dla CEL i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne.

CML [µg/mg białka]	ZDR	eS-N	PRE	DO	HD
ZDR		<0,05	<0,05	ns	<0,05
eS-N	<0,05		<0,05	ns	<0,05
PRE	<0,05	<0,05		<0,05	<0,05
DO	ns	ns	<0,05		<0,05
HD	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	

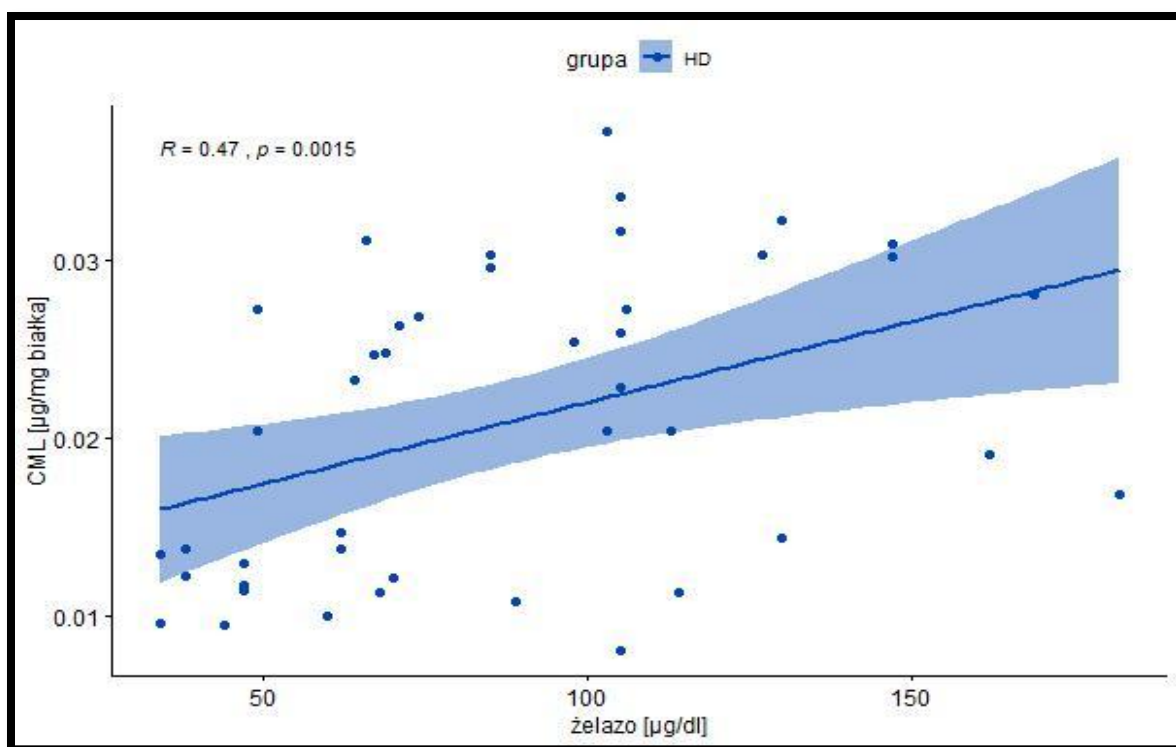
Analizy porównawcze wykonano testem Kruskala-Wallisa. Wyróżniono wartość p, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ . ns - oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami pod względem analizowanego parametru.

Stężenie CML wykazywało umiarkowaną dodatnią zależność z wartością UIBC w grupie DO oraz umiarkowaną dodatnią zależność ze stężeniem żelaza w grupie HD. Zależności pomiędzy stężeniem CML a wybranymi parametrami laboratoryjnymi przedstawiono na rycinach 39-40 (Ryc. 39-40).



Ryc.39. Zależność pomiędzy stężeniem CML a wartością UIBC w grupie DO.





Ryc.40. Zależność pomiędzy stężeniem CML a stężeniem żelaza w grupie HD.

Zależności pomiędzy stężeniem CML a ocenianymi parametrami laboratoryjnymi, dla których zależności te były statystycznie istotne, przedstawiono w tabeli 11 (Tabela 11).

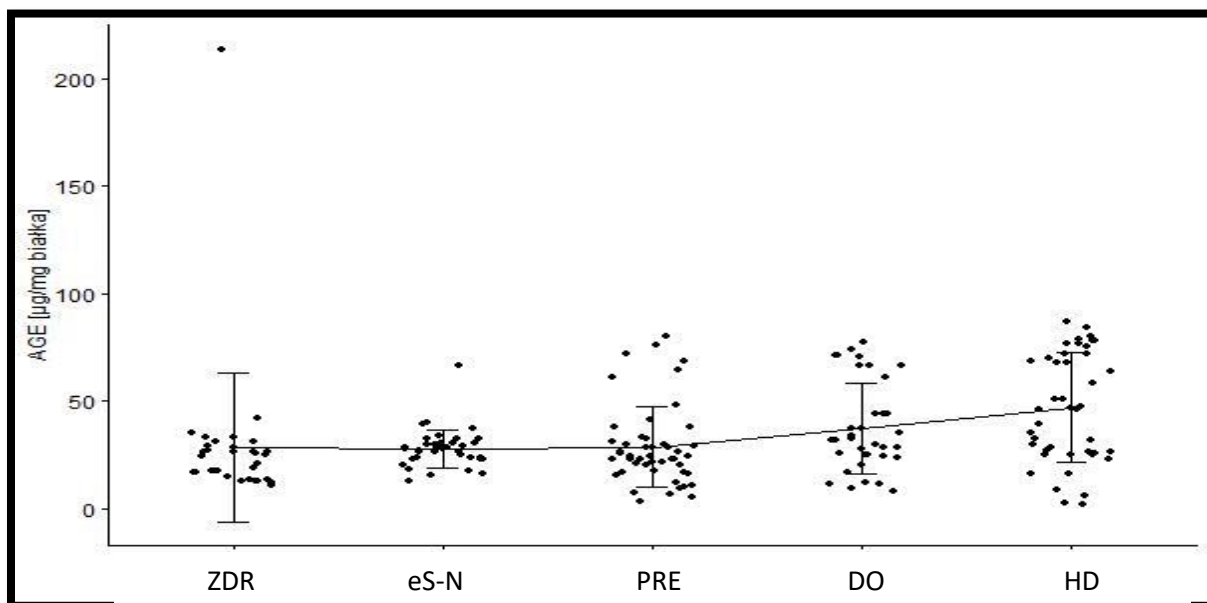
Tabela 11. Wyniki testu korelacji dla CML i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne

	Korelacje			
	r	p*	test korelacji	siła korelacji
	DO (n=35)			
UIBC [µg/dl]	-0,4191054	0,01221099	Pearson	umiarkowana
	HD (n=43)			
żelazo [µg/dl]	0,4698926	0,001476627	Spearman	umiarkowana

\*Wyróżniono wartość p, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ .

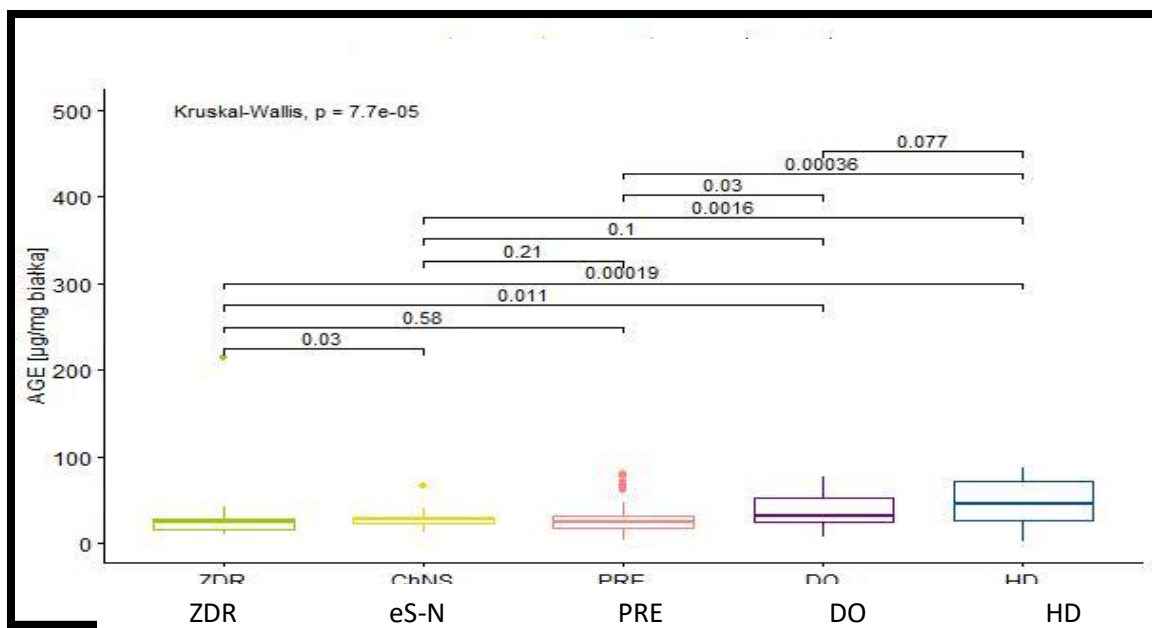
#### 4.2.2.4 AGEs

Średnie stężenie AGEs najniższe było w grupie eS-N, a najwyższe – w grupie HD. Grupa PRE nie odróżniała się od grupy ZDR i eS-N. Nie stwierdzono również istotnych różnic pomiędzy grupami eS-N i DO. W ocenie całościowej jedynie grupy ZDR i HD odróżniały od wszystkich pozostałych grup w sposób statystycznie istotny. Rozkład stężenia AGEs z przedstawiono na rycinie 41 (Ryc. 41).

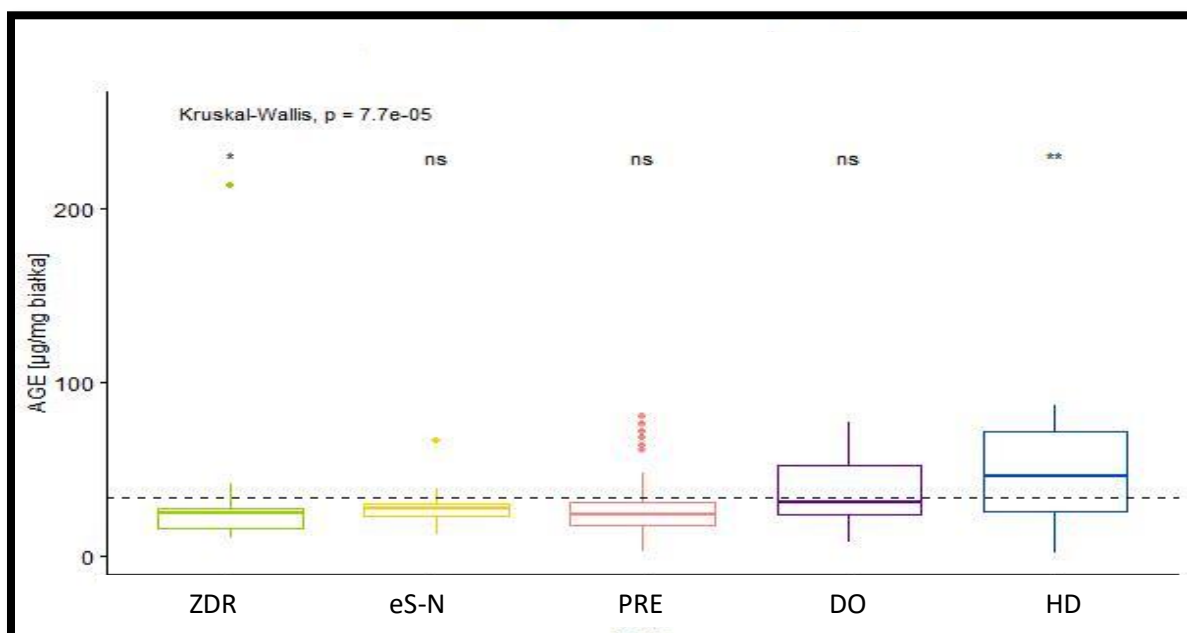


Ryc. 41. Porównanie stężenia AGEs dla 5 grup badanych.

Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu AGEs przedstawiono na rycinach 42-43 (Ryc. 42-43) i dla ułatwienia analizy w tabeli 12 (Tabela 12).



Ryc. 42. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu AGEs.



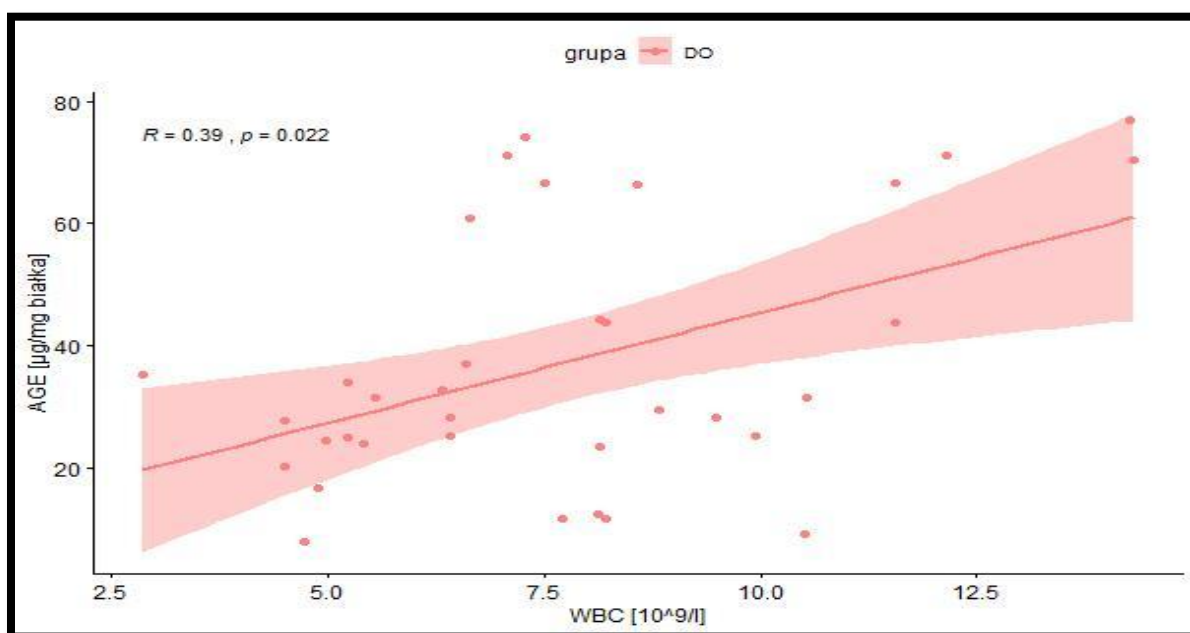
Ryc. 43. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu AGEs, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami. W przypadku, gdy nie wykazano istotnie statystycznych różnic ( $p > 0,05$ ) wprowadzono oznaczenie „ns”.

Tabela 12. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu AGEs.

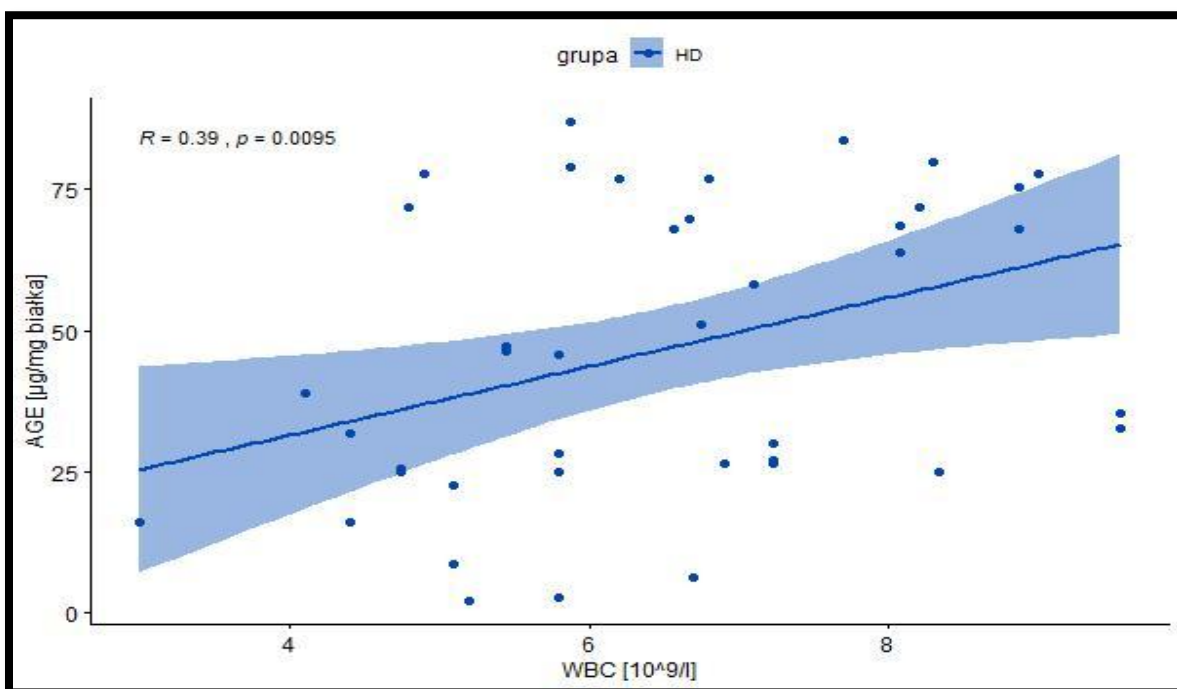
AGEs [μg/mg białka]	ZDR	eS-N	PRE	DO	HD
ZDR		<0,05	ns	<0,05	<0,05
eS-N	<0,05		ns	ns	<0,05
PRE	ns	ns		<0,05	<0,05
DO	<0,05	ns	<0,05		<0,05
HD	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	

Analizy porównawcze wykonano testem Kruskala-Wallisa. Wyróżniono wartość p, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ . ns - oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami pod względem analizowanego parametru.

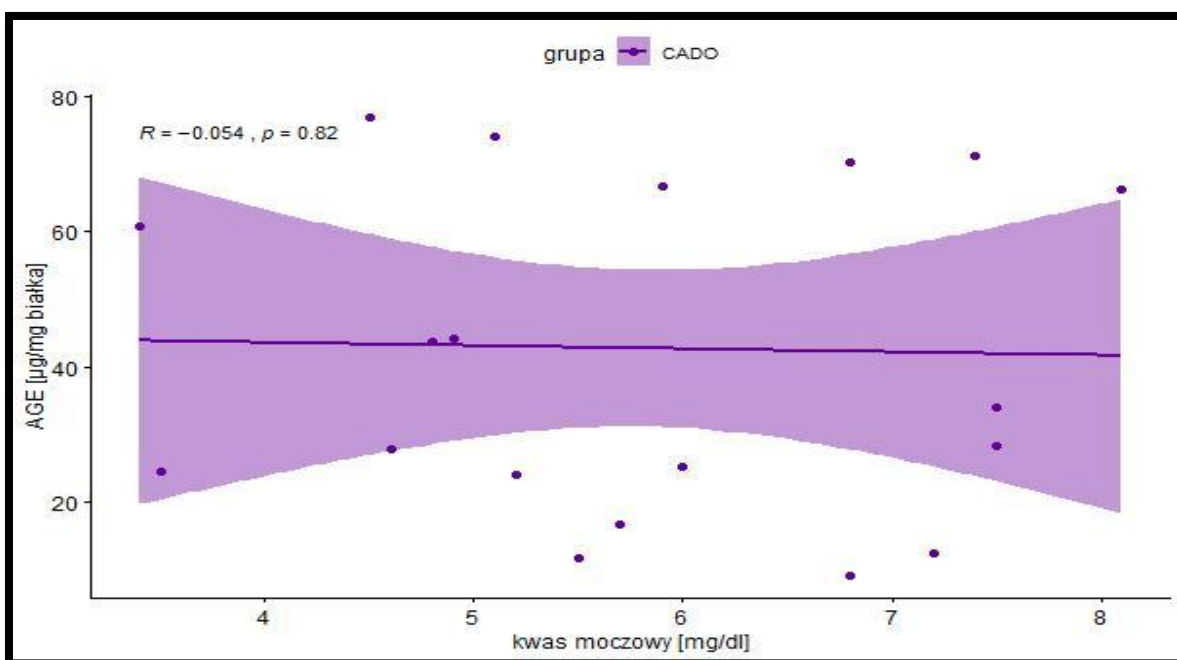
W przypadku oceny stężenia AGEs zależności dotyczyły: w grupie DO – wartości WBC (zależność umiarkowana dodatnia), w grupie HD stężenie AGEs wykazywało zależność z wartością WBC oraz ze stężeniem kwasu moczowego. Zależności pomiędzy stężeniem AGEs a wybranymi parametrami laboratoryjnymi przedstawiono na rycinach 44-46 (Ryc. 44-46).



Ryc. 44. Zależność pomiędzy stężeniem AGEs a wartością WBC w grupie HD.



Ryc. 45. Zależność pomiędzy stężeniem AGEs a wartością WBC w grupie HD.



Ryc. 46. Zależność pomiędzy stężeniem AGEs a stężeniem kwasu moczowego w grupie HD.

Zależności pomiędzy stężeniem AGEs a ocenianymi parametrami laboratoryjnymi, dla których zależności te były statystycznie istotne, przedstawiono w tabeli 13 (Tabela 13).

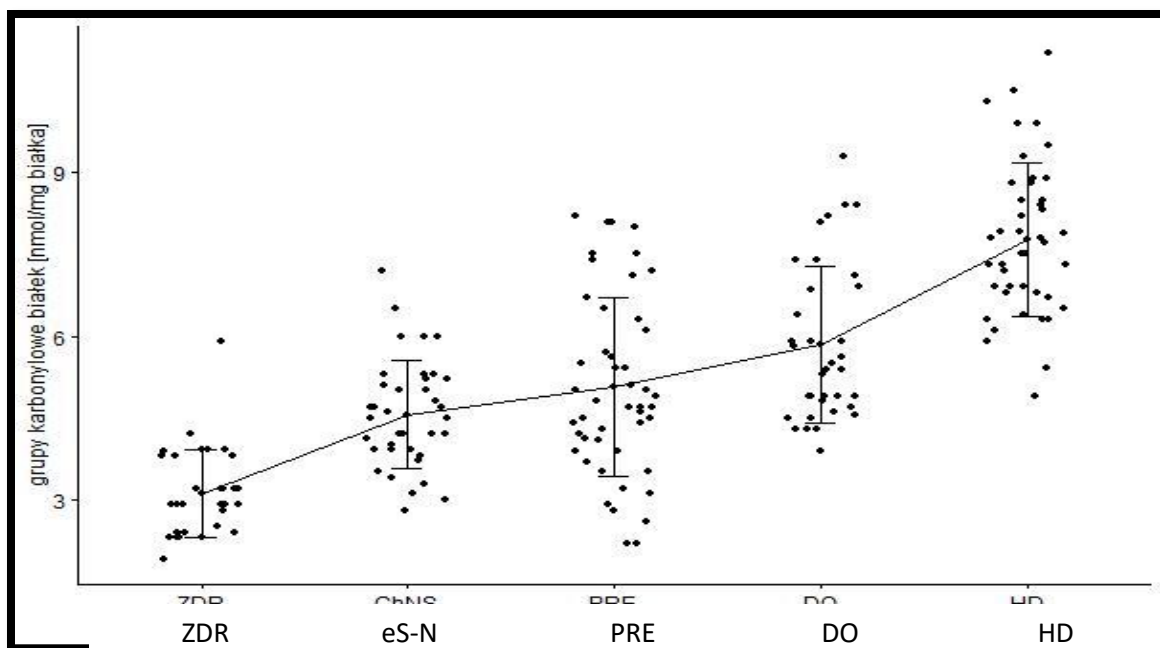
Tabela 13. Wyniki testu korelacji dla AGEs i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne.

	Korelacje			
	r	p*	test korelacji	siła korelacji
	DO (n=35)			
WBC [ $10^9/l$ ]	0.385397	0.02223331	Spearman	umiarkowana
	HD (n=43)			
WBC [ $10^9/l$ ]	0.3913686	0.009454069	Spearman	umiarkowana
kwasic moczowy [mg/dl]	-0.3101472	0.04296422	Spearman	umiarkowana

\*Wyróżniono wartość p, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ .

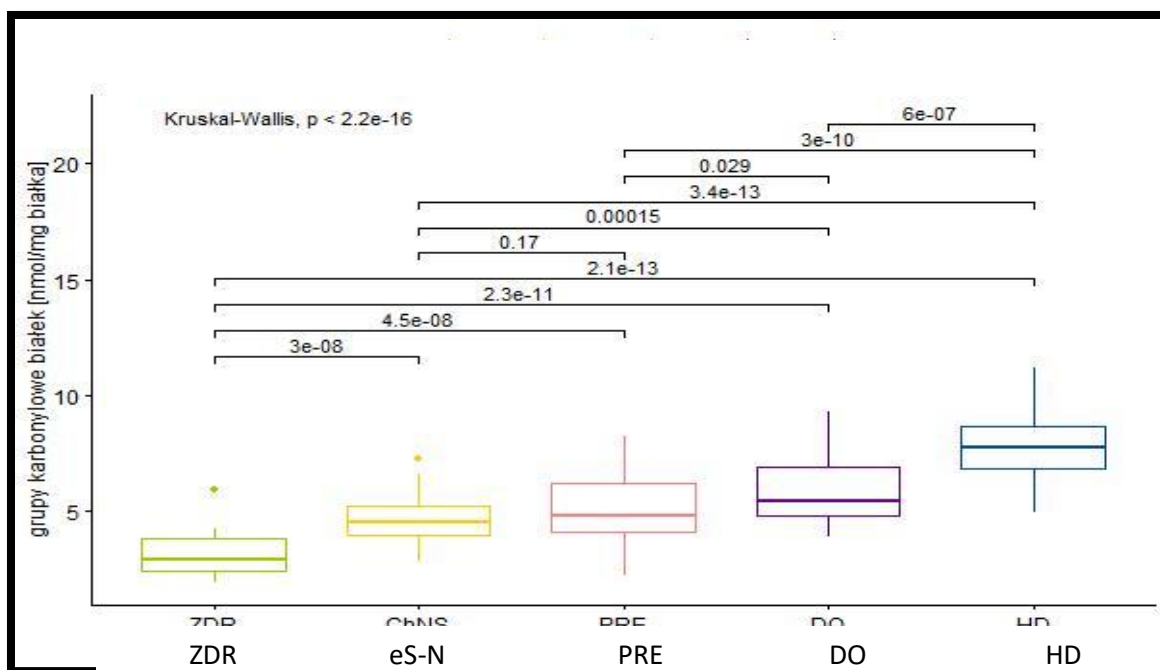
#### 4.2.3. OCENA STĘŻENIA GRUP KARBONYLOWYCH BIAŁEK ORAZ KORELACJE ICH STĘŻENIA Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI

Średnie stężenie grup karbonylowych białek najniższe było w grupie ZDR. Zaobserwowano stopniowy wzrost średniego stężenia grup karbonylowych białek w pozostałych grupach: poczynając od grupy eS-N, przez grupę PRE, następnie – grupę DO, a kończąc – na grupie HD. Na tle wszystkich grup w sposób statystycznie istotny wyróżniały się grupy ZDR, eS-N i HD. Grupy te różniły się też statystycznie istotnie pomiędzy sobą. Rozkład stężenia grup karbonylowych białek przedstawiono na rycinie 47 (Ryc. 47).

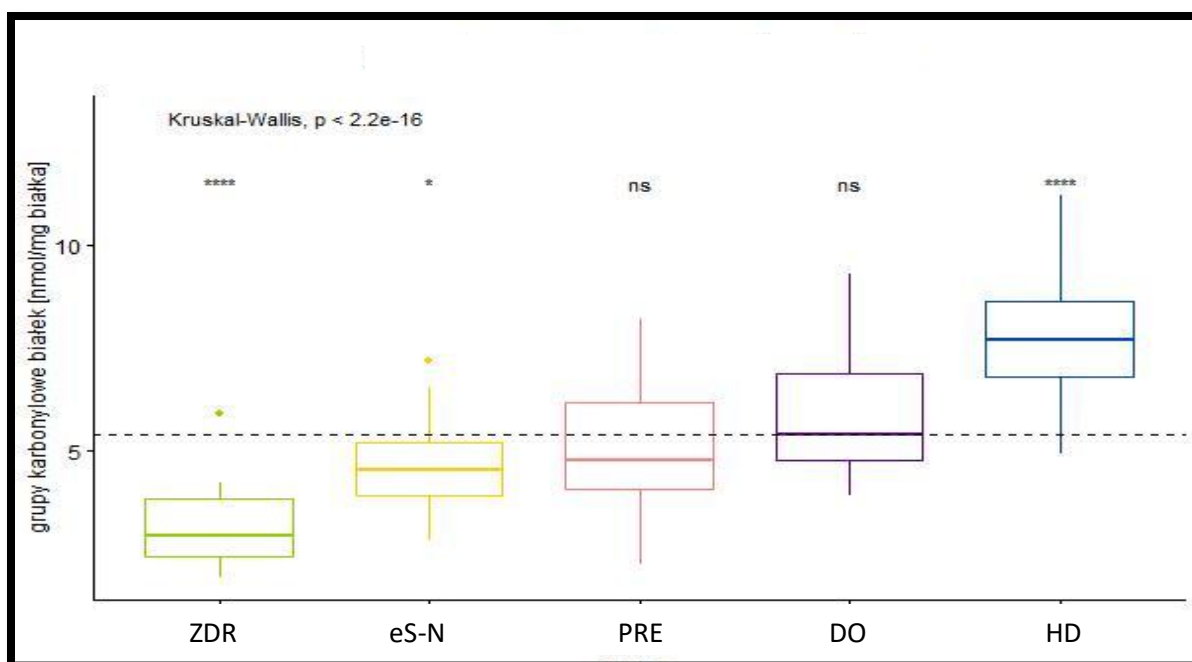


Ryc. 47. Porównanie stężenia grup karbonylowych białek dla 5 grup badanych.

Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu grup karbonylowych białek przedstawiono na rycinach 48-49 (Ryc. 48-49) i dla ułatwienia analizy w tabeli 14 (Tabela 14).



Ryc. 48. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu grup karbonylowych białek.



Ryc. 49. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu grup karbonylowych białek, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami. W przypadku, gdy nie wykazano istotnie statystycznych różnic ( $p > 0,05$ ) wprowadzono oznaczenie „ns”.

Tabela 14. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu grup karbonylowych białek.

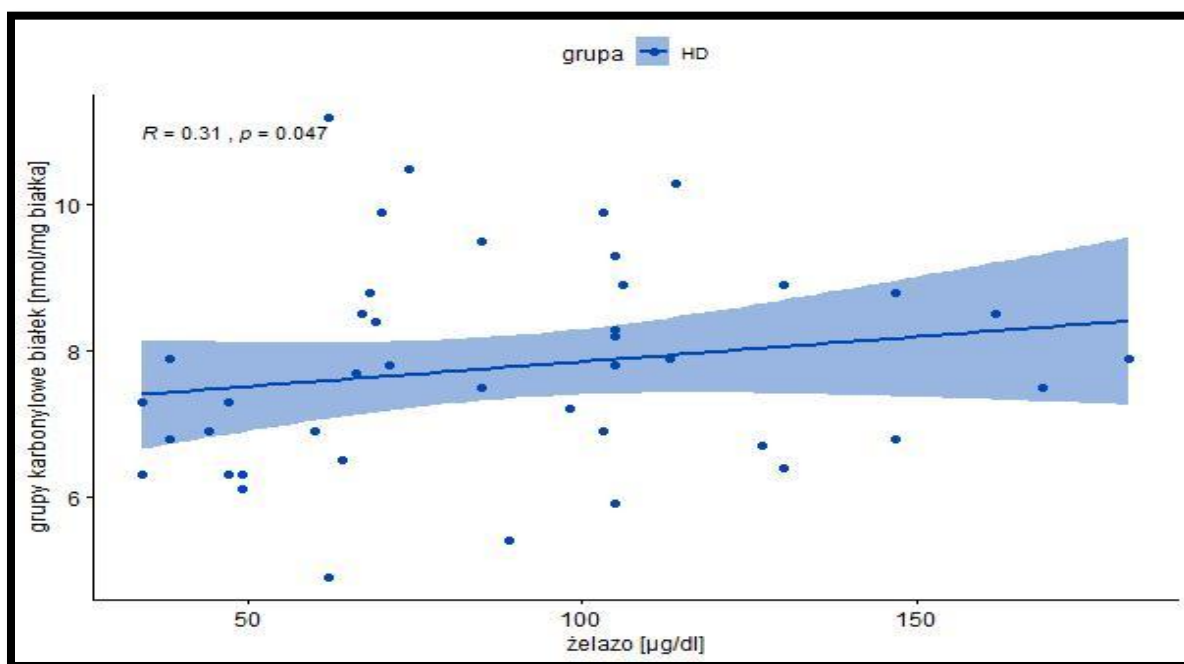
grupy karbonylowe [nmol/mg białka]	ZDR	eS-N	PRE	DO	HD
ZDR		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
eS-N	<0,05		ns	<0,05	<0,05
PRE	<0,05	ns		<0,05	<0,05
DO	<0,05	<0,05	<0,05		<0,05
HD	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	

Analizy porównawcze wykonano testem Kruskala-Wallisa. Wyróżniono wartość  $p$ , gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ . ns - oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami pod względem analizowanego parametru.

W grupie eS-N stwierdzono umiarkowaną zależność dodatnią z wiekiem pacjentów, a w grupie HD – umiarkowaną zależność dodatnią ze stężeniem żelaza. Zależności pomiędzy



stężeniem grup karbonylowych białek a wybranymi parametrami laboratoryjnymi przedstawiono na rycinie 50 (Ryc. 50).



Ryc. 50. Zależność pomiędzy stężeniem grup karbonylowych białek a stężeniem żelaza w grupie HD.

Zależności pomiędzy stężeniem grup karbonylowych białek a ocenianymi parametrami laboratoryjnymi, dla których zależności te były statystycznie istotne, przedstawiono w tabeli 15 (Tabela 15).

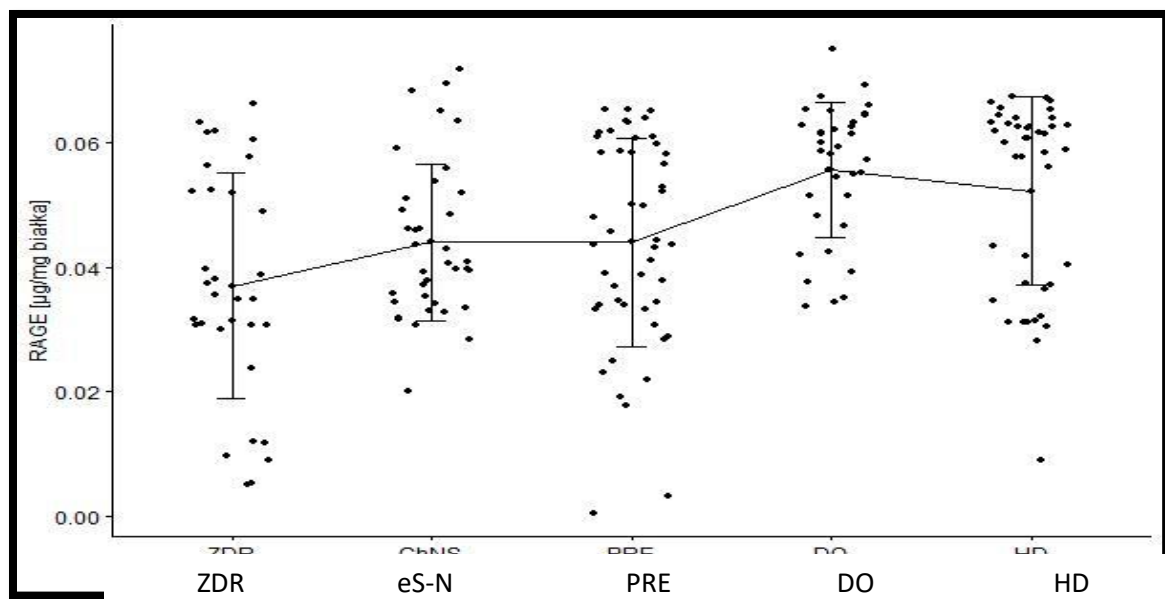
Tabela 15. Wyniki testu korelacji dla grup karbonylowych białek i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne.

	Korelacje			
	r	p*	test korelacji	siła korelacji
	HD (n=43)			
żelazo [µg/dl]	0,3052245	0,04655898	Spearman	umiarkowana

\*Wyróżniono wartość p, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ .

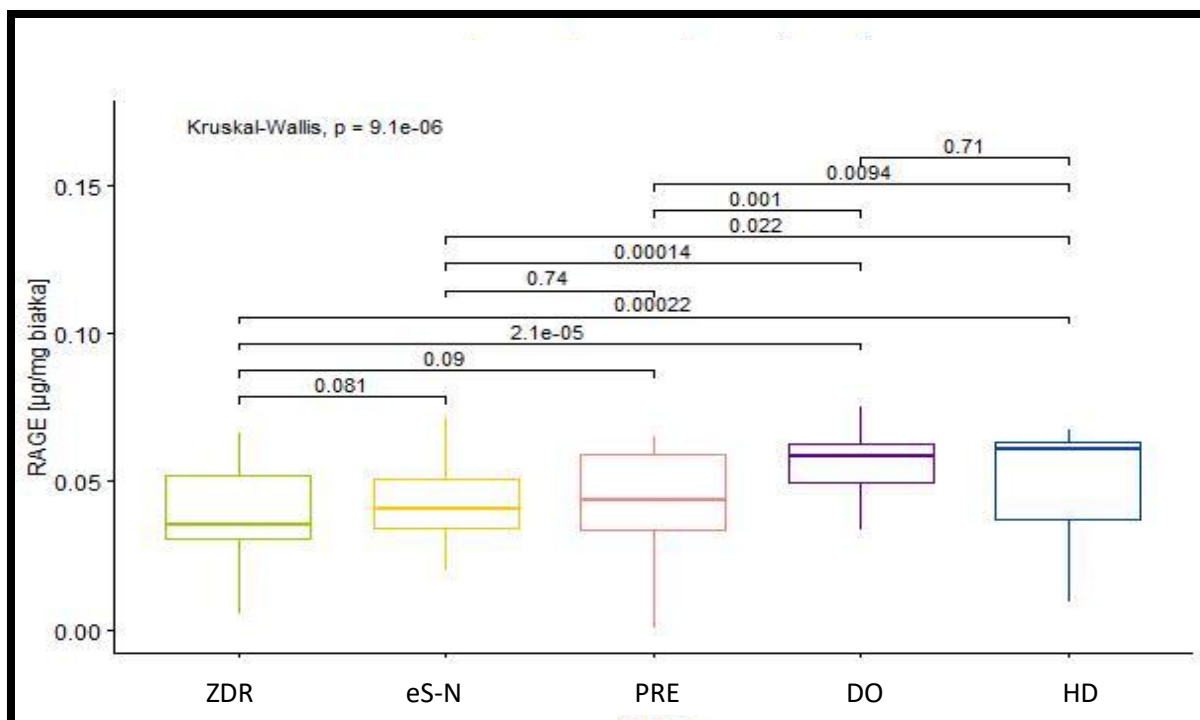
#### 4.2.4. OCENA STĘŻENIA sRAGE i KORELACJE STĘŻENIA sRAGE Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI

Średnie stężenie RAGE najniższe było w grupach ZDR, eS-N i PRE. Wyższe wartości średniego stężenia RAGE dotyczyły grupy HD, a najwyższe – grupy DO, jednak różnica pomiędzy obiema grupami nie była istotna statystycznie. Grupy ZDR, DO i HD odróżniały się istotnie w porównaniu do pozostałych grup. Rozkład stężenia sRAGE w badanych grupach przedstawiono na rycinie 51 (ryc. 51).

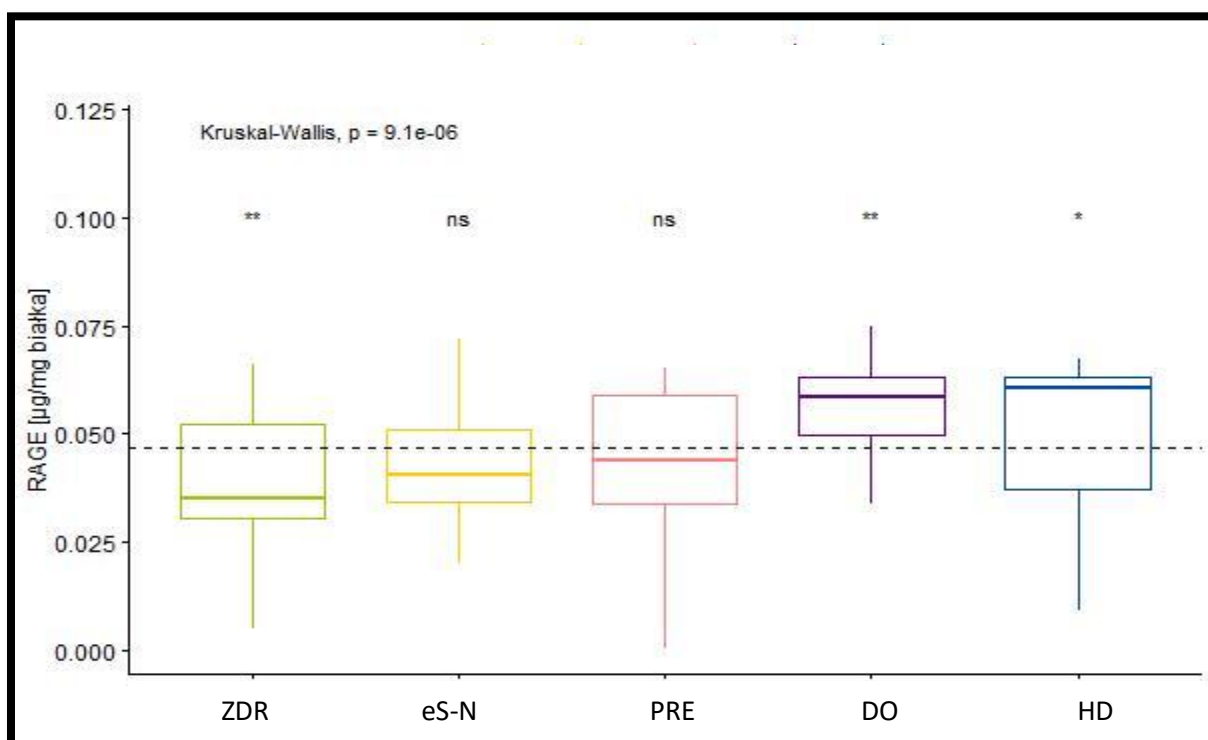


Ryc. 51. Porównanie stężenia sRAGE dla 5 grup badanych.

Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu sRAGE przedstawiono na rycinie 52-53 (Ryc. 52-53) i dla ułatwienia analizy w tabeli 16 (Tabela 16).



Ryc. 52. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu sRAGE.



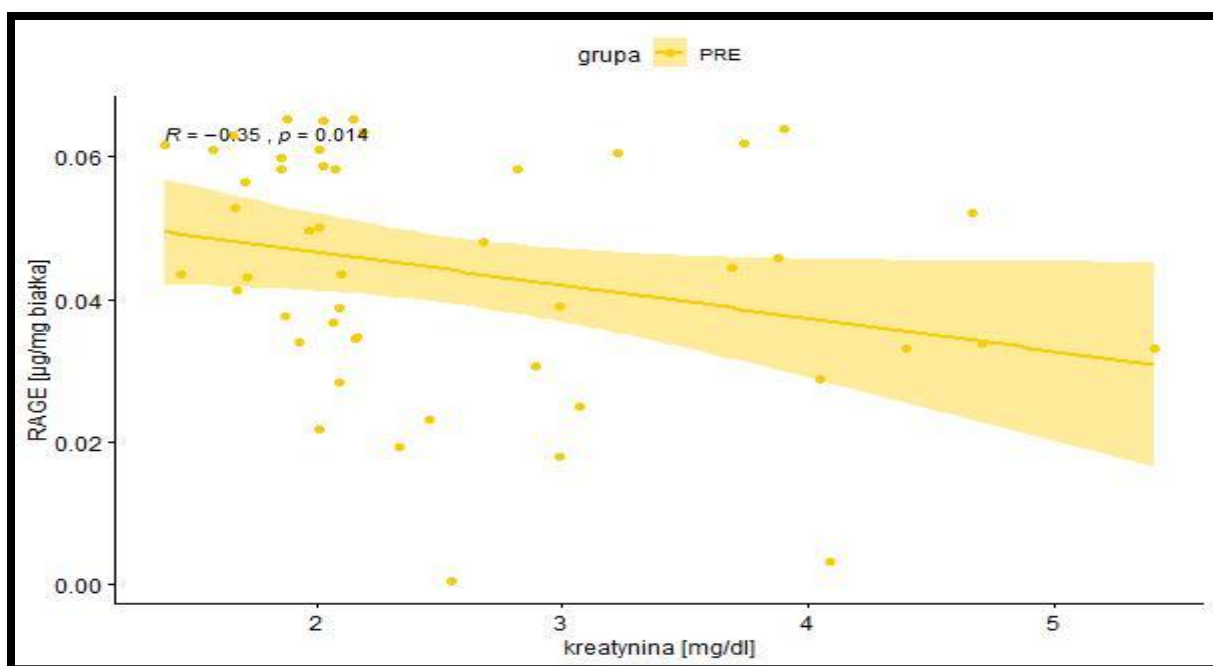
Ryc. 53. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu sRAGE, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami. W przypadku, gdy nie wykazano istotnie statystycznych różnic ( $p > 0,05$ ) wprowadzono oznaczenie „ns”.

Tabela 16. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu sRAGE.

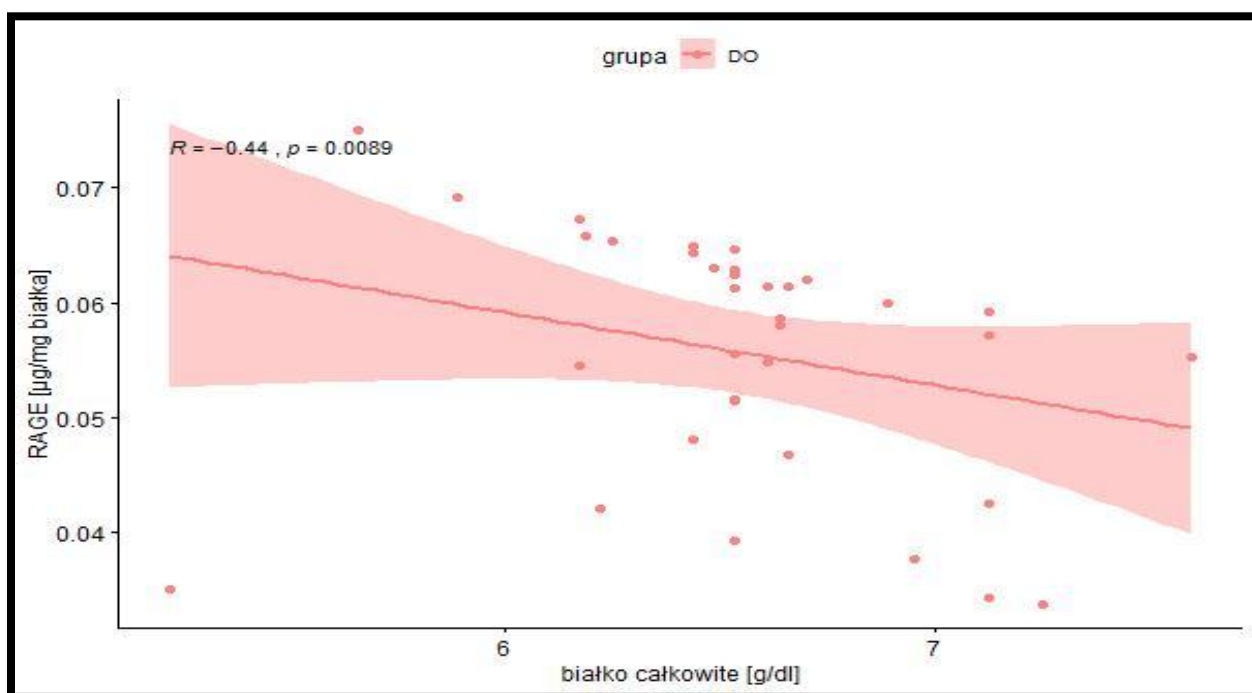
sRAGE [µg/mg białka]	ZDR	eS-N	PRE	DO	HD
<b>ZDR</b>		ns	ns	<0,05	<0,05
<b>eS-N</b>	ns		ns	<0,05	<0,05
<b>PRE</b>	ns	ns		<0,05	<0,05
<b>DO</b>	<0,05	<0,05	<0,05		ns
<b>HD</b>	<0,05	<0,05	<0,05	ns	

Analizy porównawcze wykonano testem Kruskala-Wallisa. Wyróżniono wartość p, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ . ns - oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami pod względem analizowanego parametru.

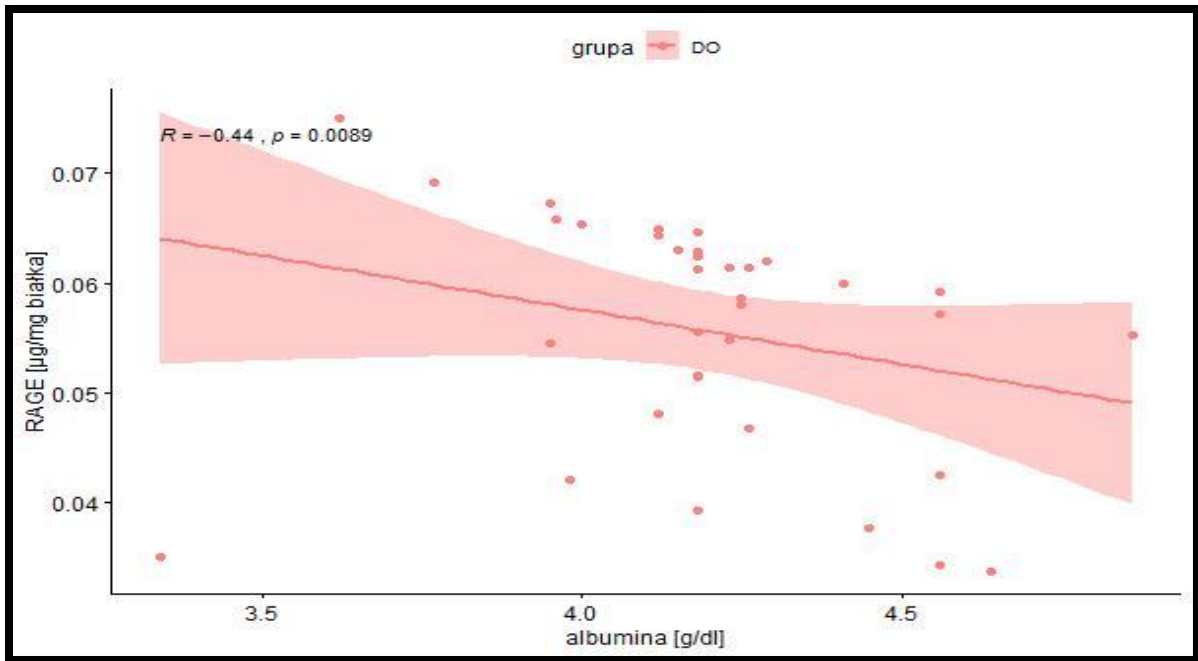
Stwierdzono szereg istotnie statystycznie zależności pomiędzy stężeniem RAGE a innymi parametrami laboratoryjnymi. W grupie PRE występowała umiarkowana zależność ze stężeniem kreatyniny (ujemna) oraz wartością eGFR (dodatnia). W grupie DO zaobserwowano ujemną zależność stężenia sRAGE od stężenia cholesterolu całkowitego, białka całkowitego i albuminy; przy czym zależności te były umiarkowane. W grupie HD stężenie sRAGE wykazywało zależność od stężenia mocznika, białka całkowitego i albuminy oraz wapnia całkowitego i zjonizowanego – były to zależności ujemne. Zależności pomiędzy stężeniem sRAGE a wybranymi parametrami laboratoryjnymi przedstawiono na rycinach 54-60 (Ryc. 54-60).



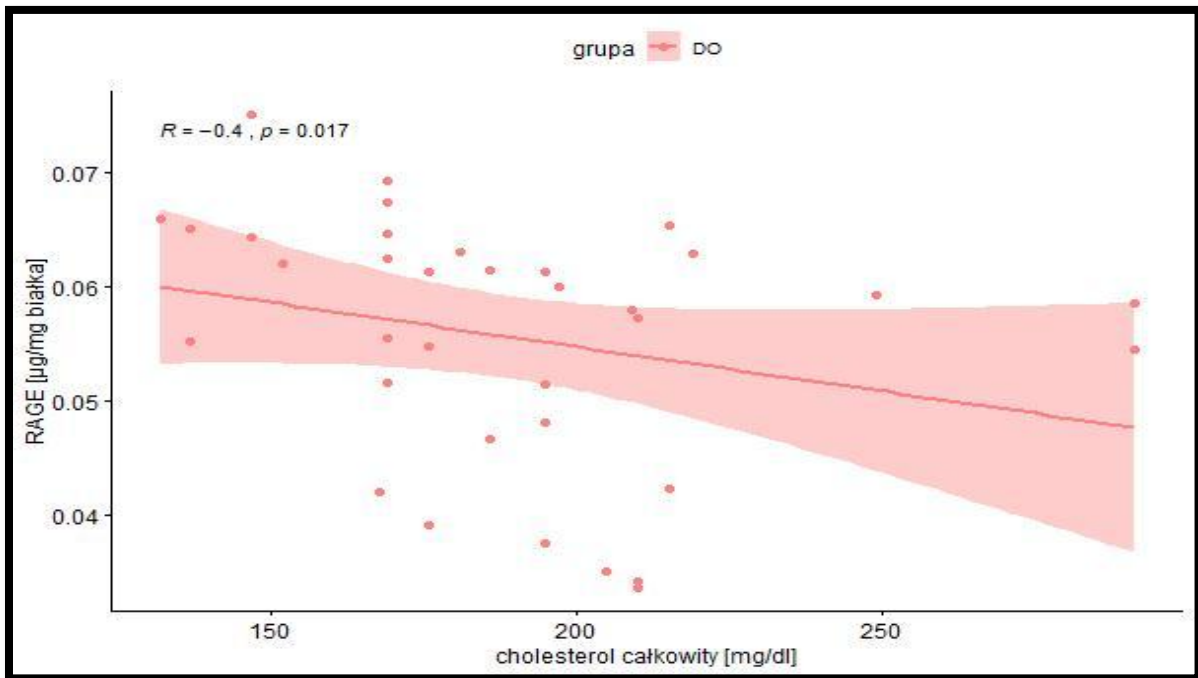
Ryc. 54. Zależność pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem kreatyniny w grupie PRE.



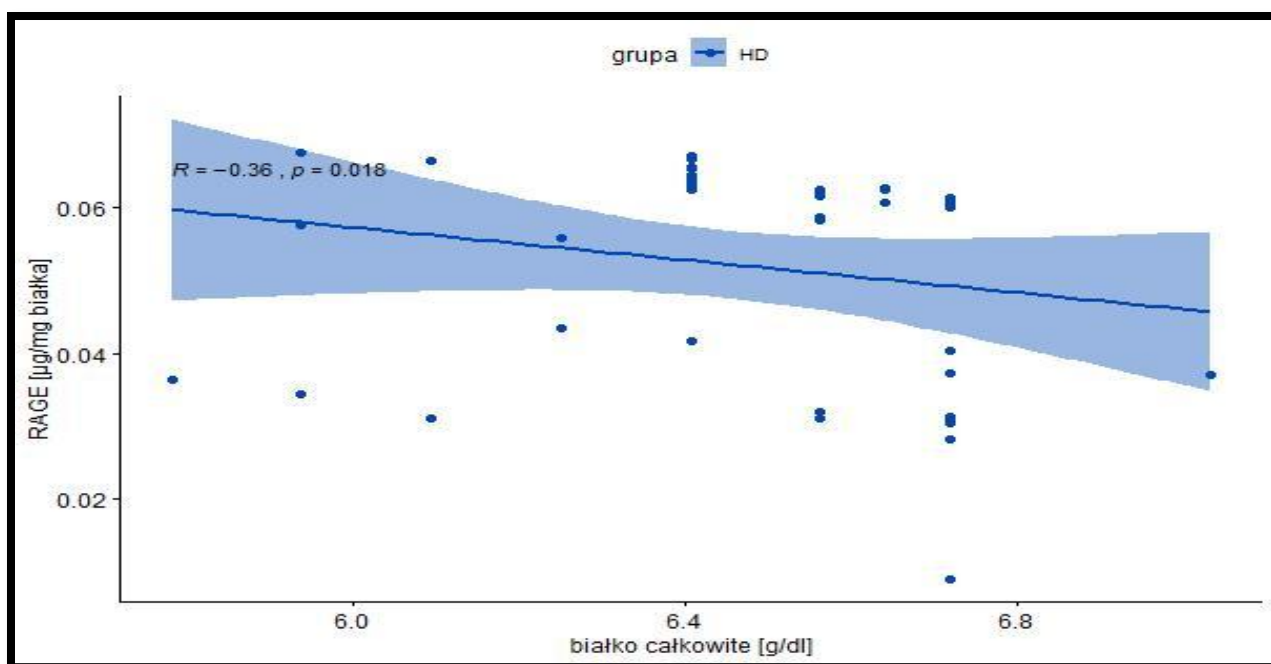
Ryc. 55. Zależność pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem białka całkowitego w grupie DO.



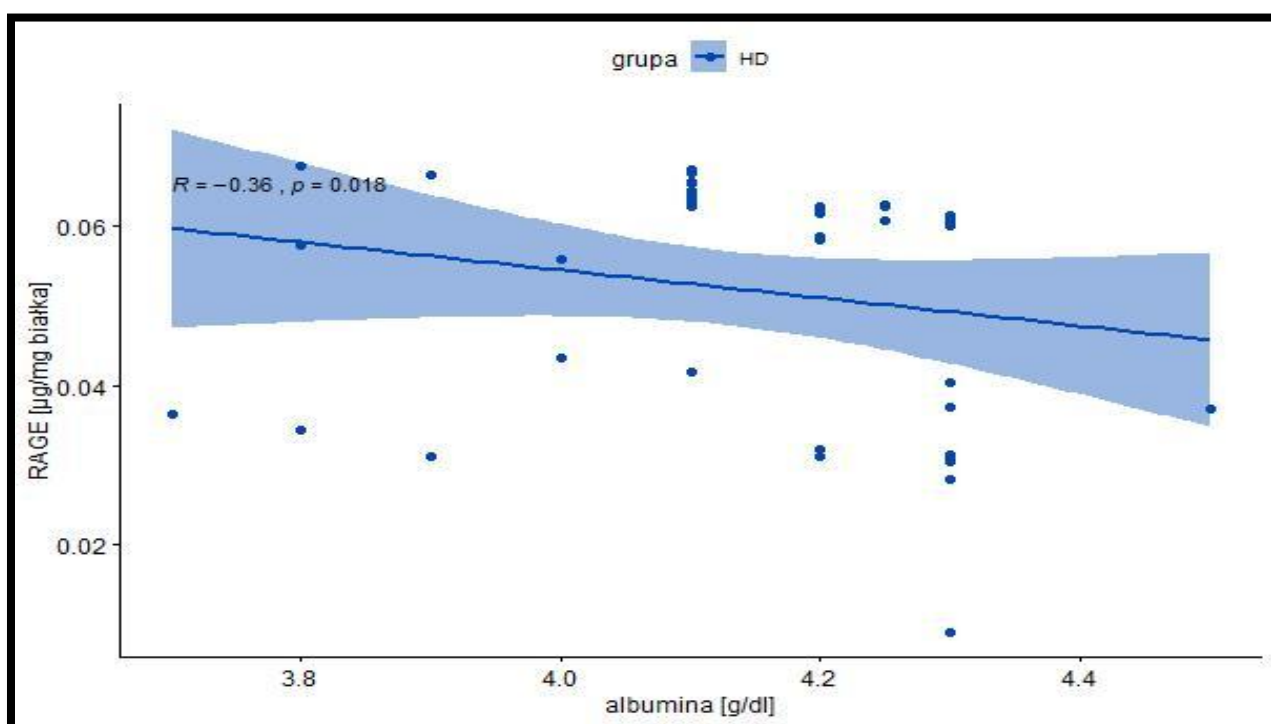
Ryc. 56. Zależność pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem albuminy w grupie DO.



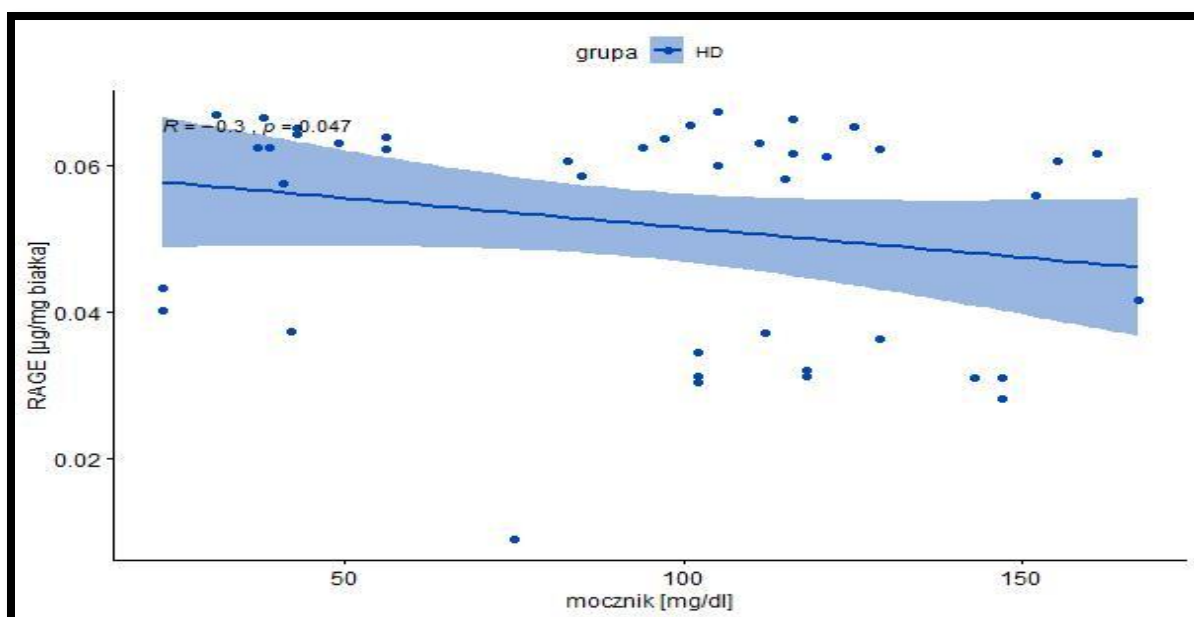
Ryc. 57. Zależność pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem cholesterolu całkowitego w grupie DO.



Ryc. 58. Zależność pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem białka całkowitego w grupie HD.



Ryc. 59. Zależność pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem albuminy w grupie HD.



Ryc. 60. Zależność pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem mocznika w grupie HD.

Zależności pomiędzy stężeniem sRAGE a ocenianymi parametrami laboratoryjnymi, dla których zależności te były statystycznie istotne, przedstawiono w tabeli 17 (Tabela 17).

Tabela 17. Wyniki testu korelacji dla sRAGE i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne.

	Korelacje			
	r	p*	test korelacji	siła korelacji
	PRE (n=48)			
kreatynina [mg/dl]	-0,3523057	0,01405675	Spearman	umiarkowana
eGFR [ml/1.73m <sup>2</sup> /min]	0,3896875	0,006184744	Spearman	umiarkowana
	DO (n=35)			
cholesterol całkowity [mg/dl]	-0,4006502	0,01707566	Spearman	umiarkowana
białko całkowite [g/dl]	-0,4356157	0,008906403	Spearman	umiarkowana
albumina [g/dl]	-0,4356157	0,008906403	Spearman	umiarkowana
	HD (n=43)			
mocznik [mg/dl]	-0,304072	0,04743492	Spearman	umiarkowana
białko całkowite [g/dl]	-0,3602142	0,01765654	Spearman	umiarkowana

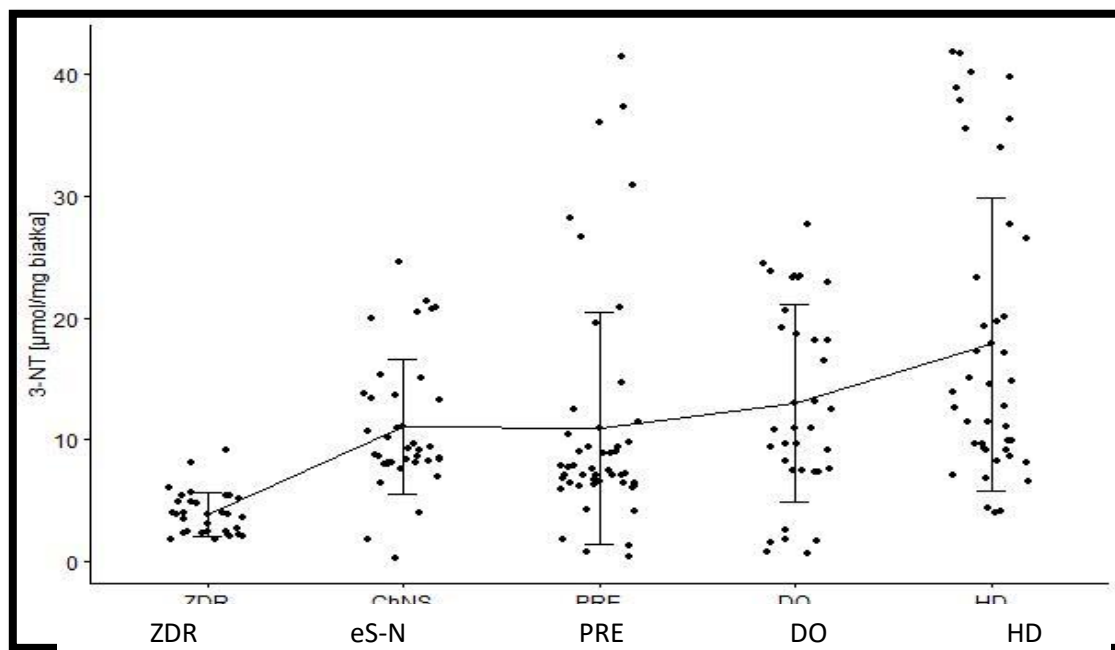


	Korelacje			
	r	p*	test korelacji	siła korelacji
albumina [g/dl]	-0,3602142	0,01765654	Spearman	umiarkowana
wapń zjonizowany [mg/dl]	-0,308843	0,04389387	Spearman	umiarkowana
wapń całkowity [mg/dl]	-0,308843	0,04389387	Spearman	umiarkowana

\*Wyróżniono wartość p, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ .

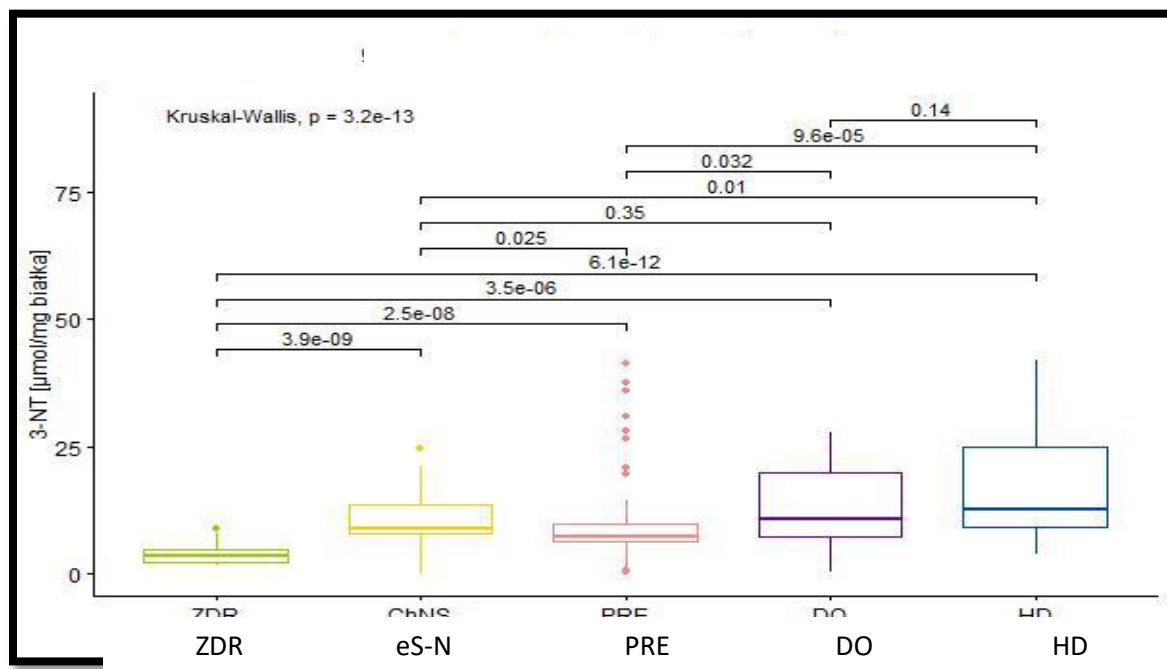
#### 4.2.5. OCENA STĘŻENIA 3-NITROTYROZYNY ORAZ KORELACJE JEJ STĘŻENIA Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI

Średnie stężenie 3-nitrotyrozyny najniższe było w grupie ZDR. Wyższe średnie stężenie 3-nitrotyrozyny obserwowano w grupie eS-N. W grupie NEFRO zaobserwowano wzrost średniego stężenia 3-nitrotyrozyny wraz ze spadkiem wydolności nerek: średnie stężenie w grupie PRE było niższe niż w grupach DO i HD. Najwyższe średnie stężenie 3-nitrotyrozyny dotyczyło grupy HD. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic pomiędzy grupami DO i HD. Grupy ZDR i HD odróżniały się istotnie w porównaniu do wszystkich pozostałych grup. Rozkład stężenia 3-nitrotyrozyny w badanych grupach przedstawiono na rycinie 61 (Ryc. 61).

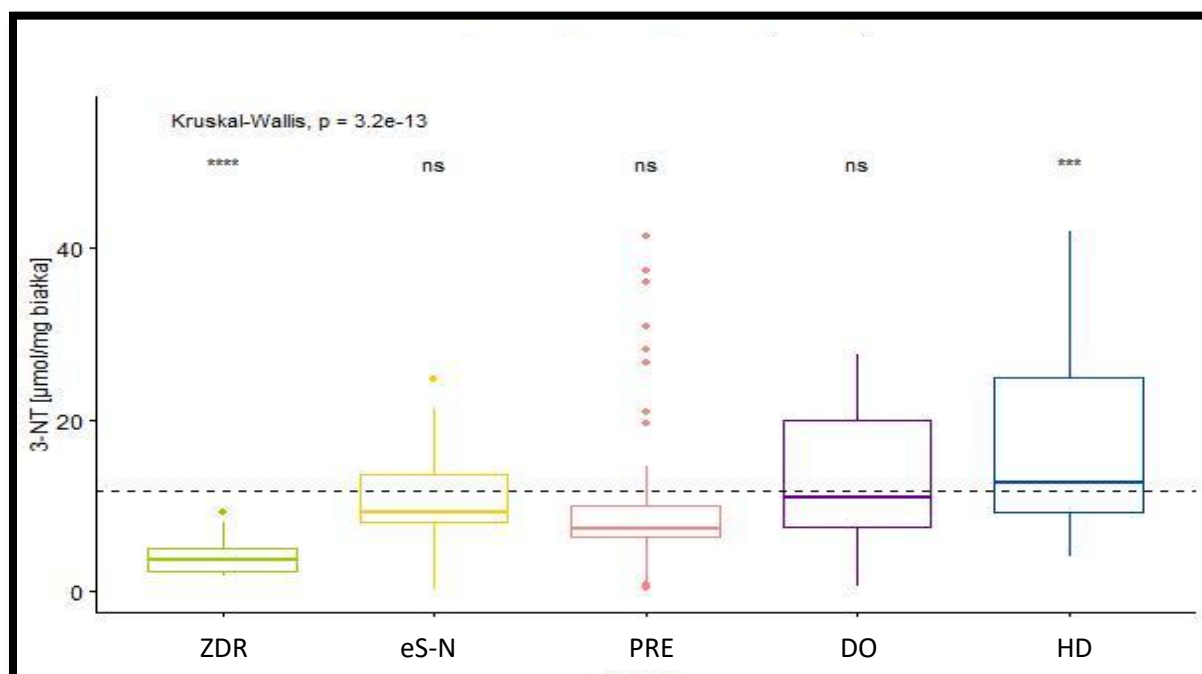


Ryc. 61. Porównanie stężenia 3-nitrotyrozyny dla 5 grup badanych.

Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu 3-nitrotyrozyny przedstawiono na rycinach 62-63 (Ryc. 62-63) i dla ułatwienia analizy w tabeli 18 (Tabela 18).



Ryc. 62. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu 3-nitrotyrozyny.



Ryc. 63. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu MG, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami. W

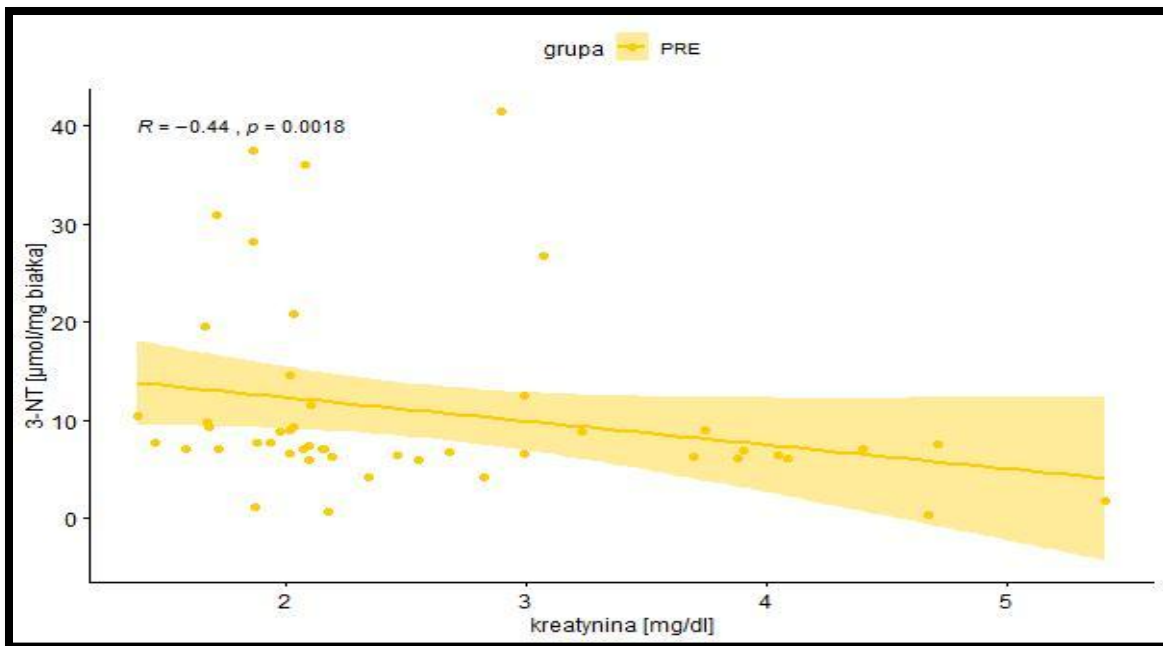
przypadku, gdy nie wykazano istotnie statystycznych różnic ( $p > 0,05$ ) wprowadzono oznaczenie „ns”.

Tabela 18. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu 3-nitrotyrozyny.

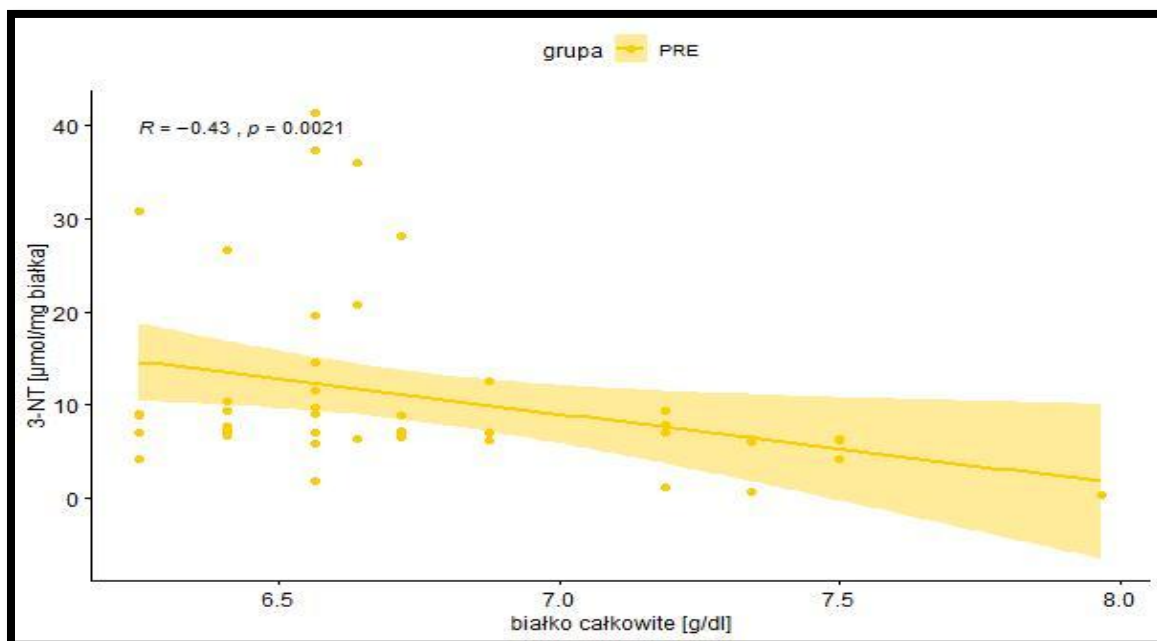
3-nitrotyrozyna [ $\mu\text{mol/mg}$ białka]	ZDR	eS-N	PRE	DO	HD
<b>ZDR</b>		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
<b>eS-N</b>	<0,05		<0,05	ns	<0,05
<b>PRE</b>	<0,05	<0,05		<0,05	<0,05
<b>DO</b>	<0,05	ns	<0,05		ns
<b>HD</b>	<0,05	<0,05	<0,05	ns	

Analizy porównawcze wykonano testem Kruskala-Wallis. Wyróżniono wartość  $p$ , gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ . ns - oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami pod względem analizowanego parametru.

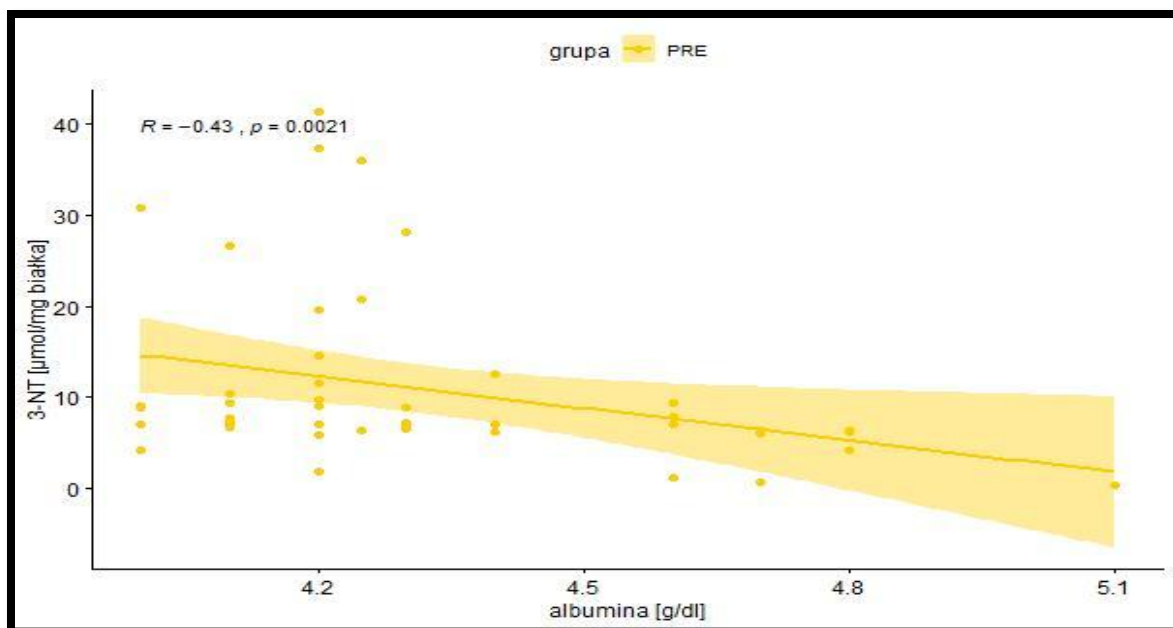
Stwierdzono szereg istotnie statystycznie zależności pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a innymi parametrami laboratoryjnymi. W grupie PRE występowała umiarkowana zależność ze stężeniem kreatyniny (ujemna) oraz wartością eGFR (dodatnia) oraz umiarkowane ujemne zależności ze stężeniem białka całkowitego i albuminy. W grupie DO zaobserwowano ujemną zależność stężenia 3-nitrotyrozyny od stężenia LDL-cholesterolu, białka całkowitego i albuminy. Dodatkowo w grupie DO stężenie 3-nitrotyrozyny wykazywało ujemną umiarkowaną zależność ze stężeniem PTH i fosforanów. W grupie HD stężenie 3-nitrotyrozyny wykazywało zależność ze stężeniem PTH i białka Klotho – były to korelacje dodatnie. Zależności pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a wybranymi parametrami laboratoryjnymi przedstawiono na rycinach 64-73 (Ryc. 64-73).



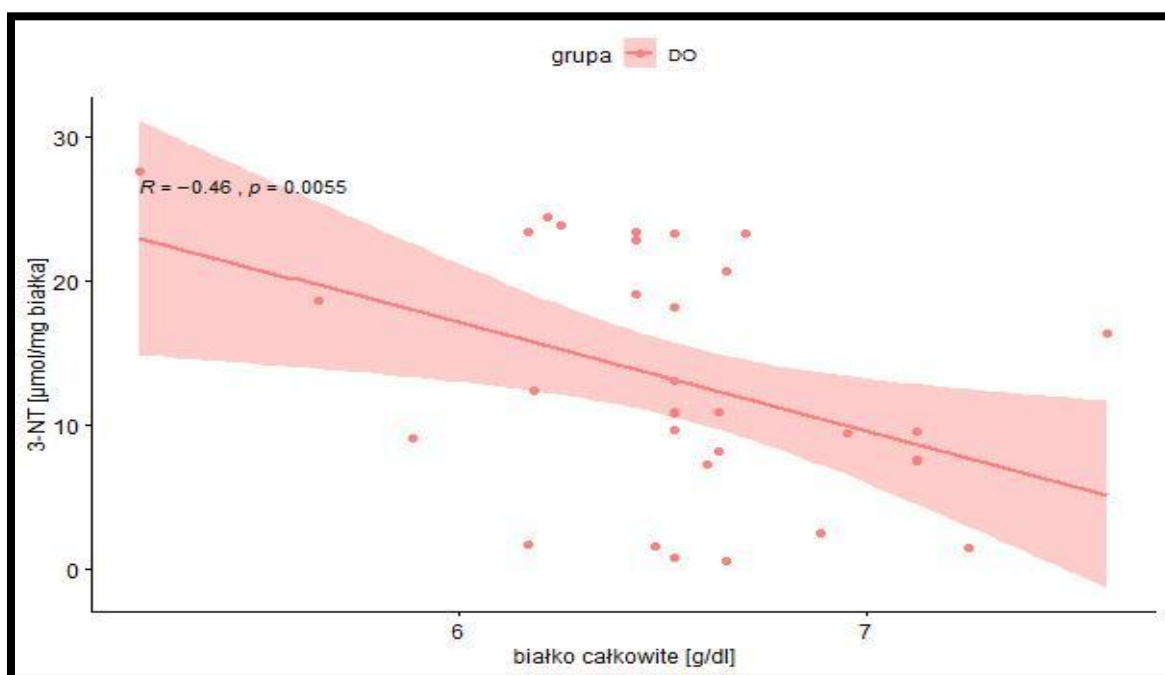
Ryc. 64. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem kreatyniny w grupie PRE.



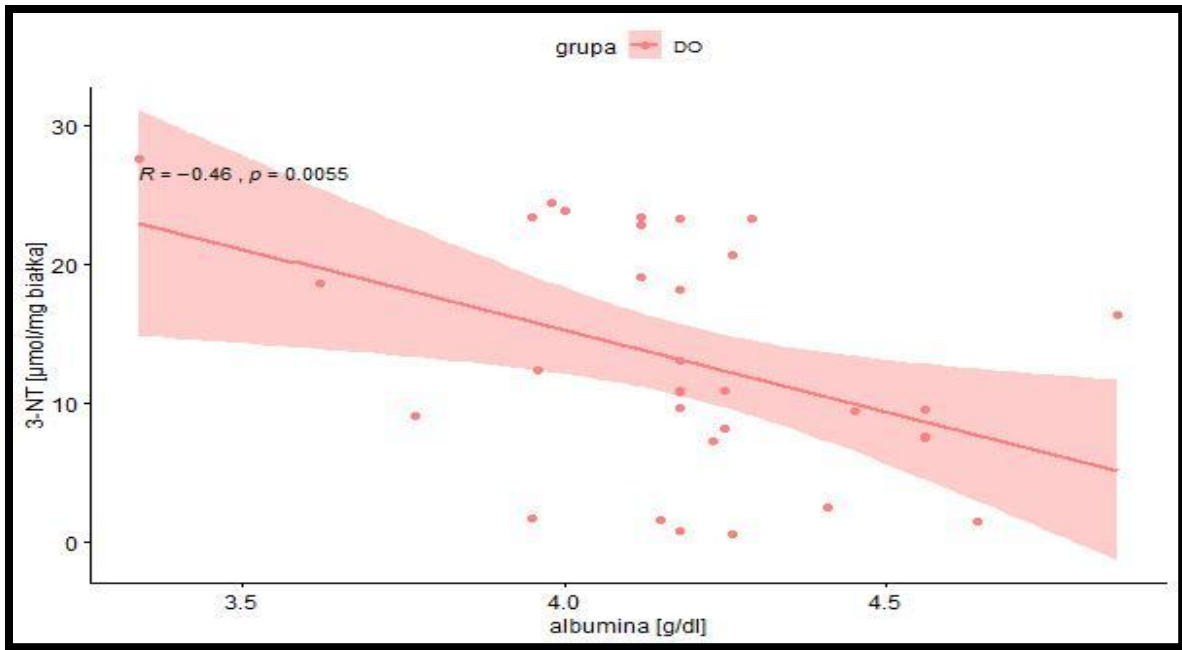
Ryc. 65. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem białka całkowitego w grupie PRE.



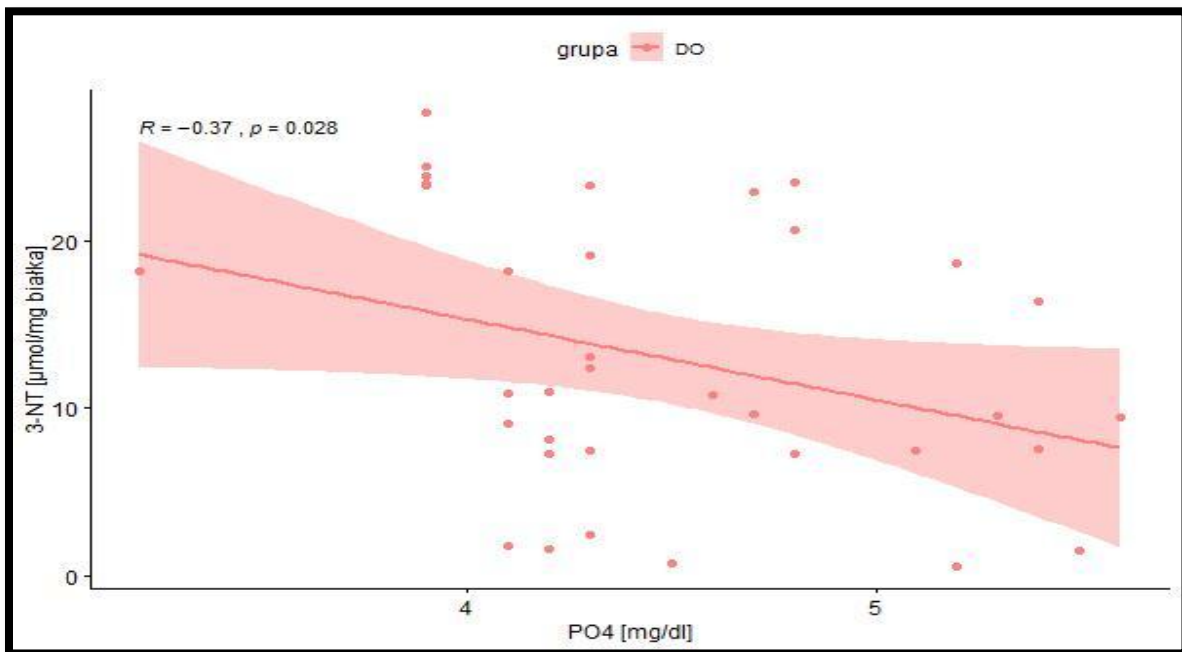
Ryc. 66. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem albuminy w grupie PRE.



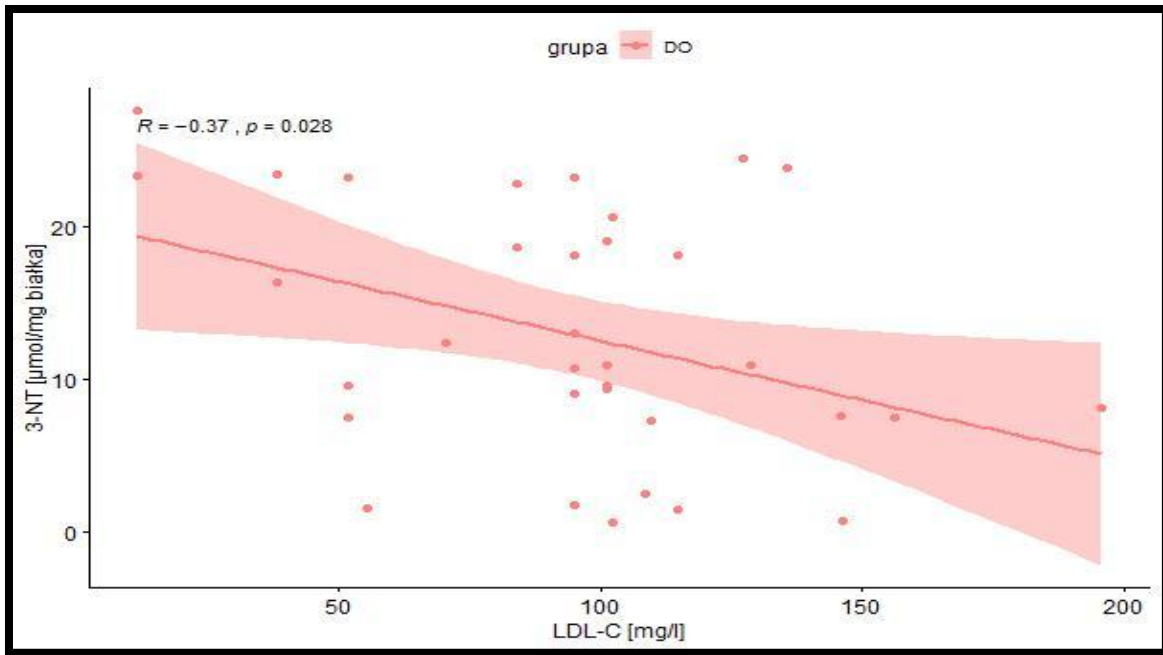
Ryc. 67. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem białka całkowitego w grupie DO.



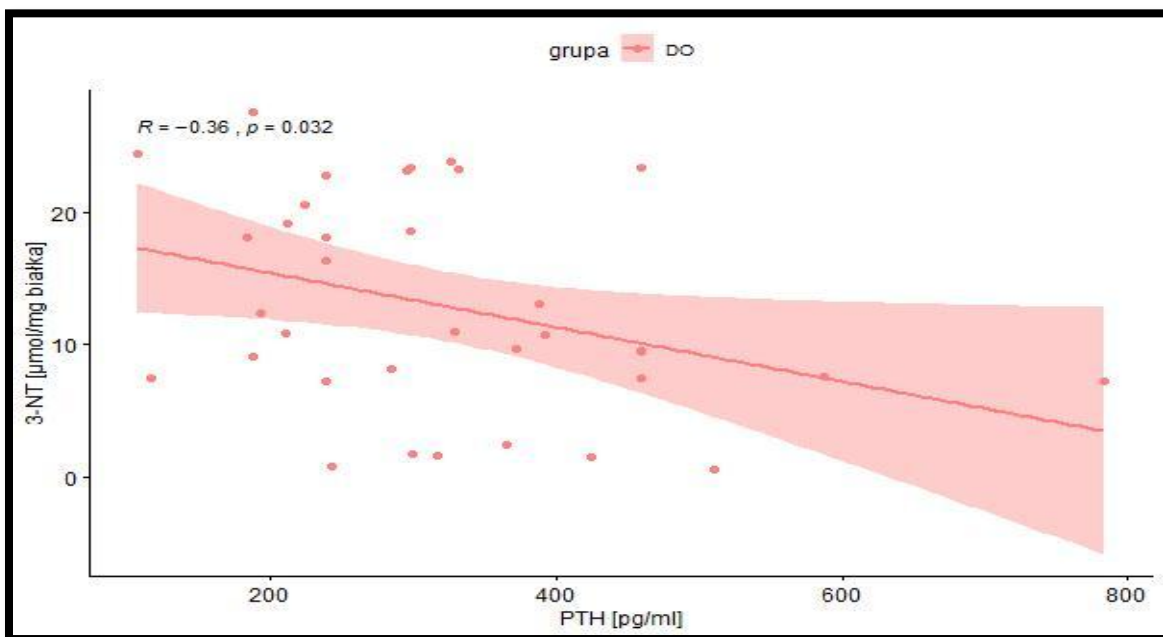
Ryc. 68. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem albuminy w grupie DO.



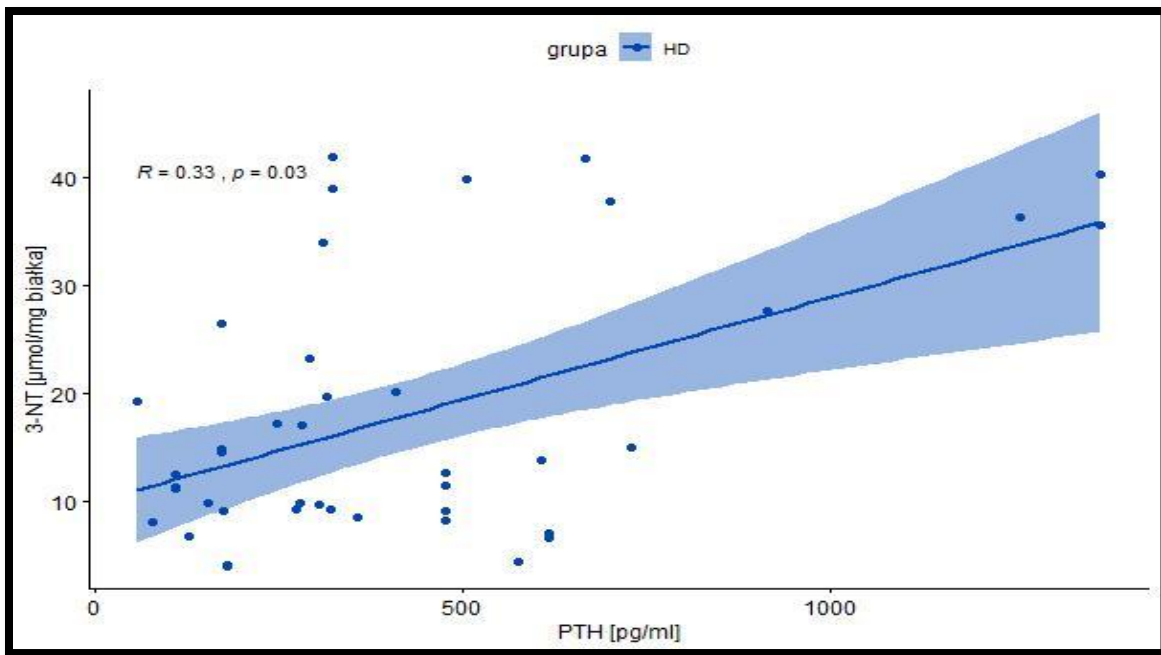
Ryc. 69. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem fosforanów (PO<sub>4</sub>) w grupie DO.



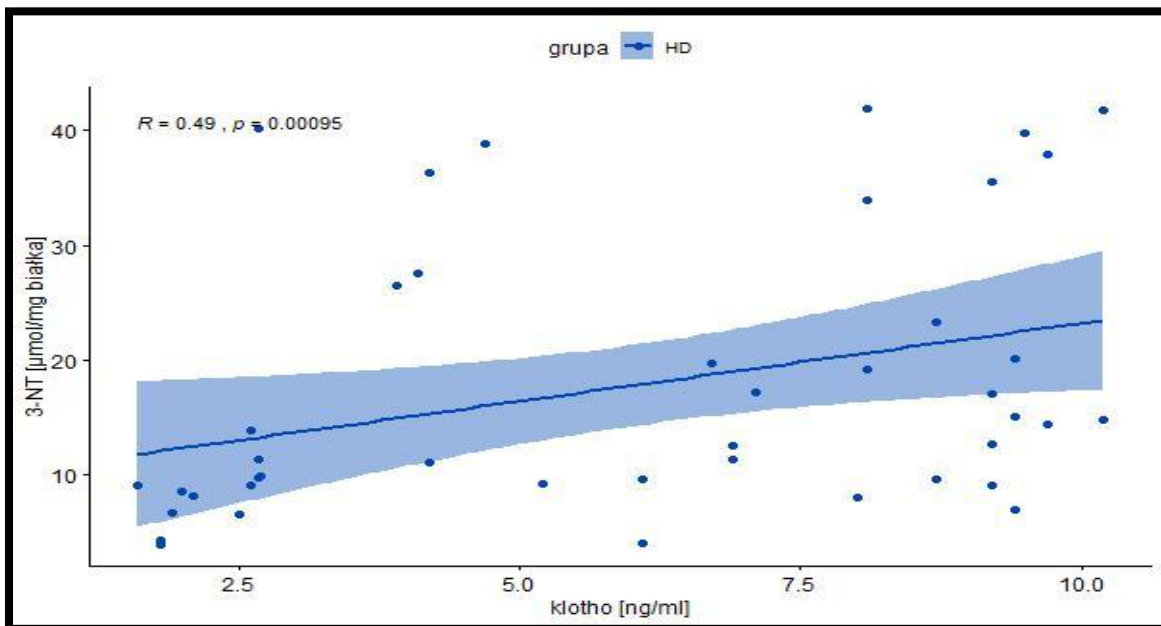
Ryc. 70. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem LDL-cholesterolu (LDL-C) w grupie DO.



Ryc. 71. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem PTH w grupie DO.



Ryc. 72. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem PTH w grupie HD.



Ryc. 73. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem białka Klotho w grupie HD.

Zależności pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a ocenianymi parametrami laboratoryjnymi, dla których zależności te były statystycznie istotne, przedstawiono w tabeli 19 (Tabela 19).



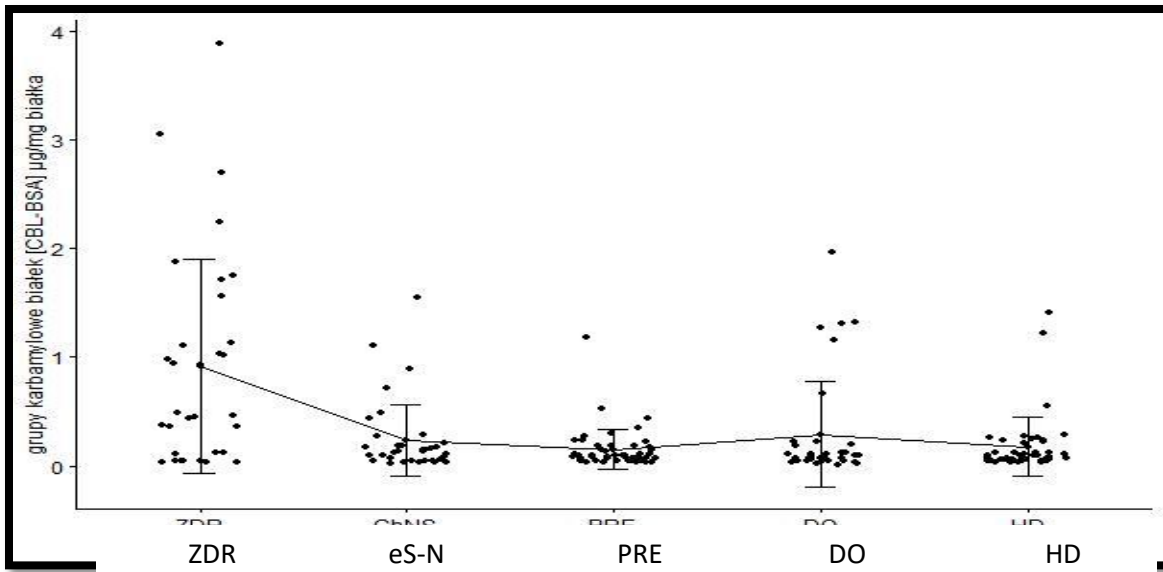
Tabela 19. Wyniki testu korelacji dla 3-nitrotyrozyny i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne.

	Korelacje			
	r	p*	test korelacji	siła korelacji
	PRE (n=48)			
kreatynina [mg/dl]	-0,4388351	0,001807681	Spearman	umiarkowana
eGFR [ml/min1.73m <sup>2</sup> ]	0,3883292	0,006382564	Spearman	umiarkowana
białko całkowite [g/dl]	-0,4336776	0,002074693	Spearman	umiarkowana
albumina [g/dl]	-0,4336776	0,002074693	Spearman	umiarkowana
	DO (n=35)			
LDL-C [mg/l]	-0,3704145	0,0284955	Spearman	umiarkowana
białko całkowite [g/dl]	-0,4594116	0,005498209	Spearman	umiarkowana
albumina [g/dl]	-0,4594116	0,005498209	Spearman	umiarkowana
PTH [pg/ml]	-0,3623293	0,03243551	Spearman	umiarkowana
PO <sub>4</sub> [mg/dl]	-0,37232	0,02762664	Spearman	umiarkowana
	HD (n=43)			
PTH [pg/ml]	0,3310293	0,0301372	Spearman	umiarkowana
klotho [ng/ml]	0,4861476	0,0009492886	Spearman	umiarkowana

\*Wyróżniono wartość p, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ .

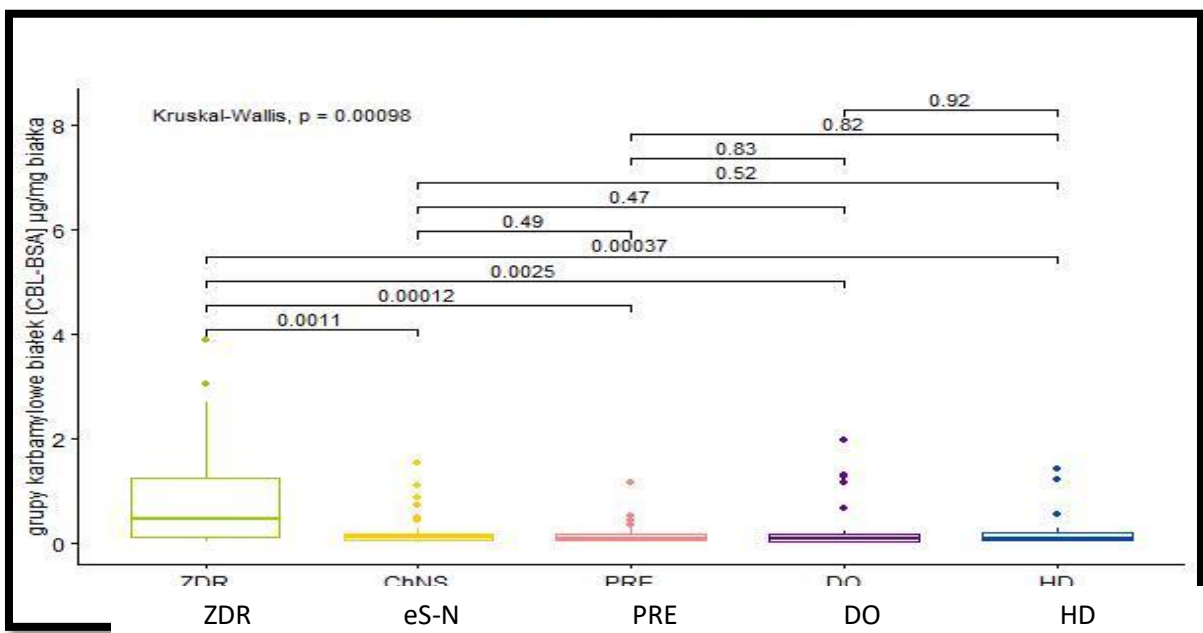
#### 4.2.6. OCENA STĘŻENIA GRUP KARBAMYLOWYCH BIAŁEK ORAZ KORELACJE ICH STĘŻENIA Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI

Średnie stężenie grup karbamylowych białek najniższe było w grupie PRE. Wzrost średniego stężenia grupa karbamylowych białek obserwowano, kolejno, w grupach: HD, eS-N, DO. Najwyższe średnie stężenie grup karbamylowych białek charakteryzowało grupę ZDR. Grupa ZDR była jedyną grupą, która odróżniała się od innych grup w sposób statystycznie istotny. Rozkład stężenia grup karbamylowych białek przedstawiono na rycinie 74 (Ryc. 74).

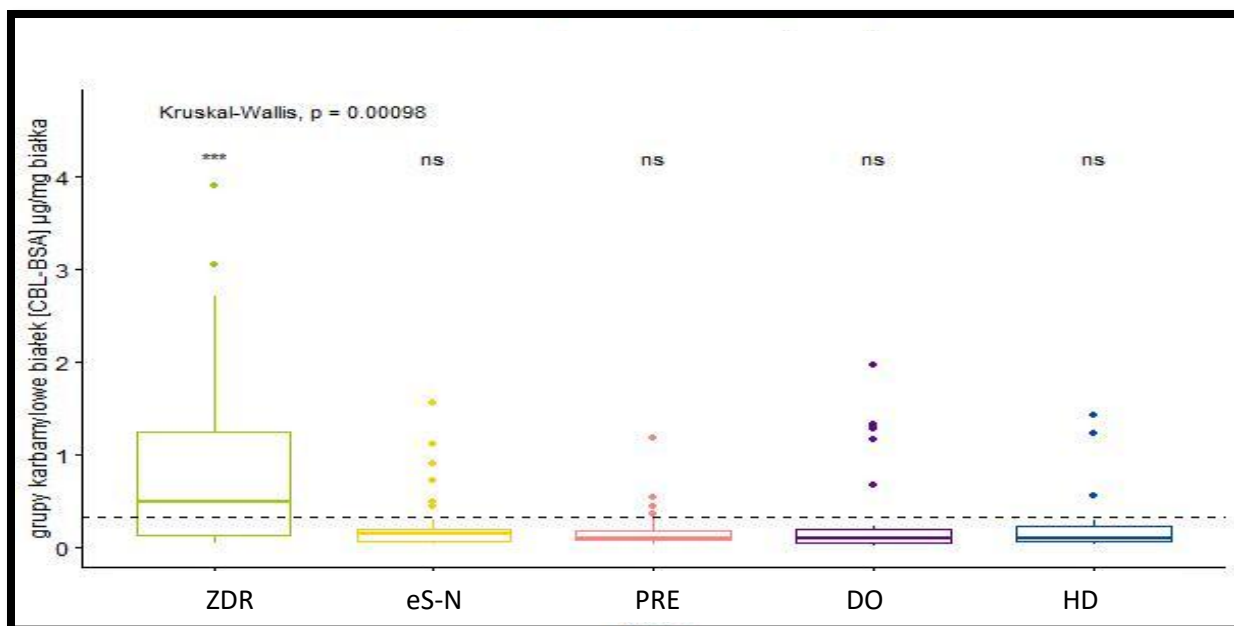


Ryc. 74. Porównanie stężenia grup karbamylowych białek dla 5 grup badanych.

Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu grup karbamylowych białek przedstawiono na rycinach 75-76 (Ryc. 75-76) i dla ułatwienia analizy w tabeli 20 (Tabela 20).



Ryc. 75. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu grup karbamylowych białek



Ryc. 76. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu grup karbamyłowych białek, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami. W przypadku, gdy nie wykazano istotnie statystycznych różnic ( $p > 0,05$ ) wprowadzono oznaczenie „ns”.

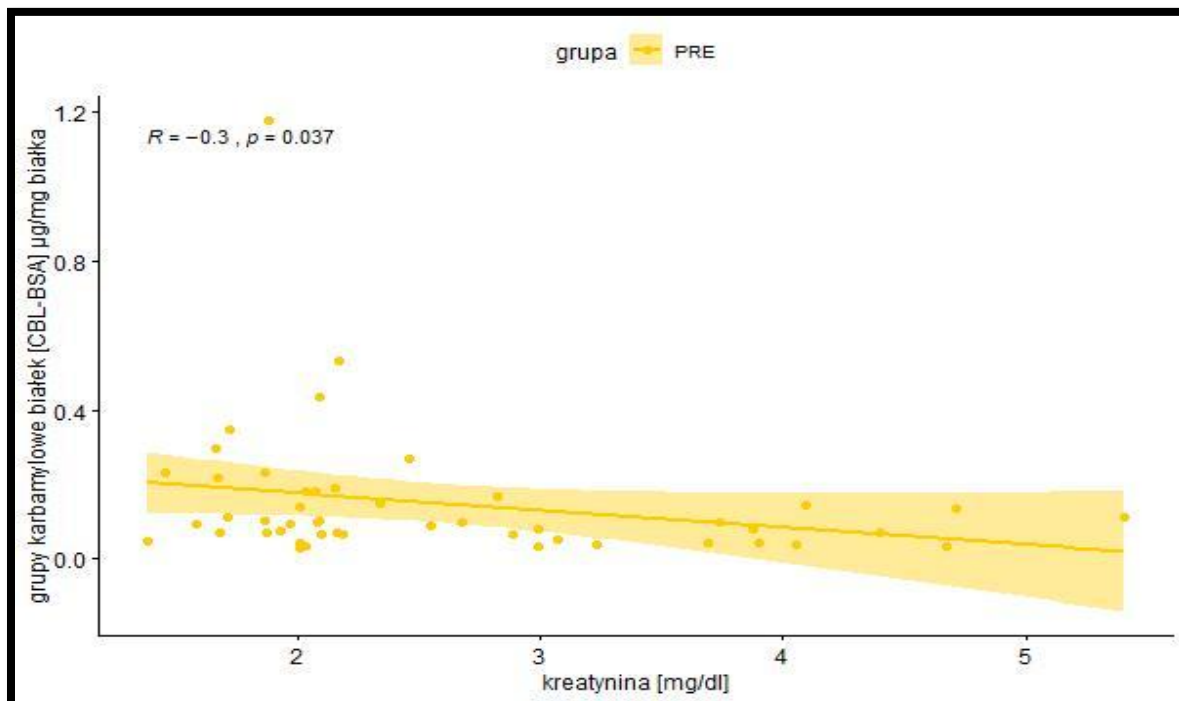
Tabela 20. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu grup karbamyłowych białek.

grupy karbamyłowe [µg/mg białka]	ZDR	eS-N	PRE	DO	HD
<b>ZDR</b>		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
<b>eS-N</b>	<0,05		ns	ns	ns
<b>PRE</b>	<0,05	ns		ns	ns
<b>DO</b>	<0,05	ns	ns		ns
<b>HD</b>	<0,05	ns	ns	ns	

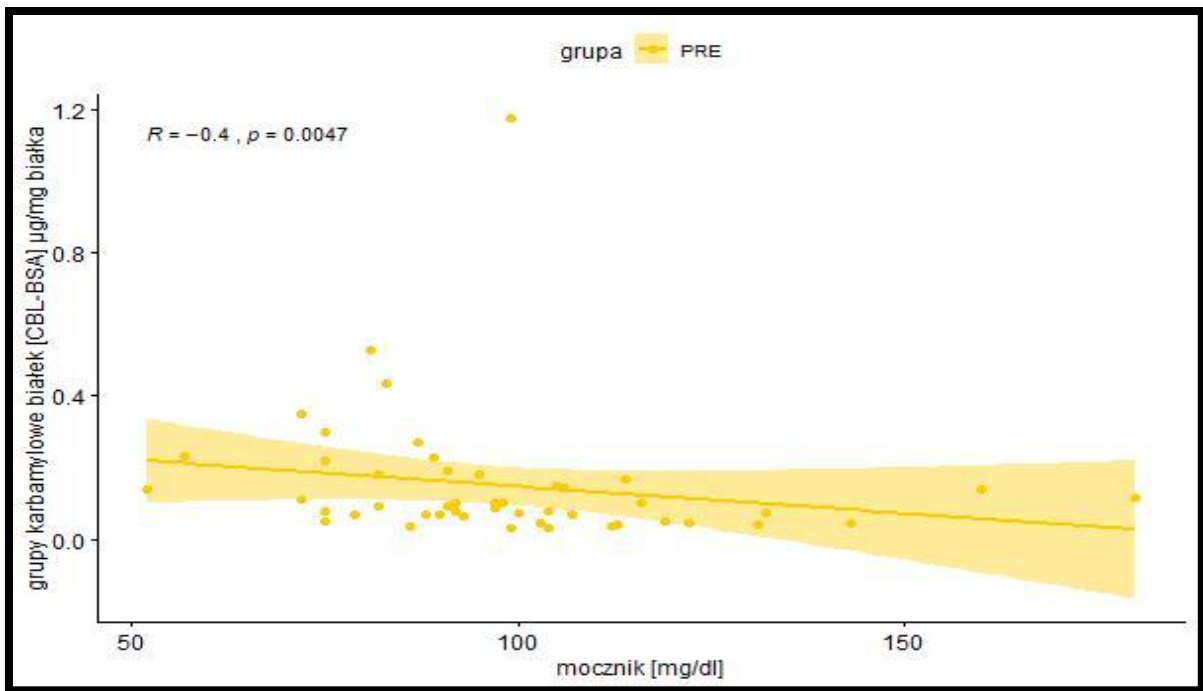
Analizy porównawcze wykonano testem Kruskala-Wallisa. Wyróżniono wartość  $p$ , gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ . NS oznacza brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami pod względem analizowanego parametru.

Analiza zależności stężenia grup karbamyłowych białek wykazała umiarkowaną ujemną zależność od stężenia mocznika i kreatyniny w grupie PRE. W grupie DO stężenie grup karbamyłowych białek wykazywało ujemną zależność od stężenia cholesterolu

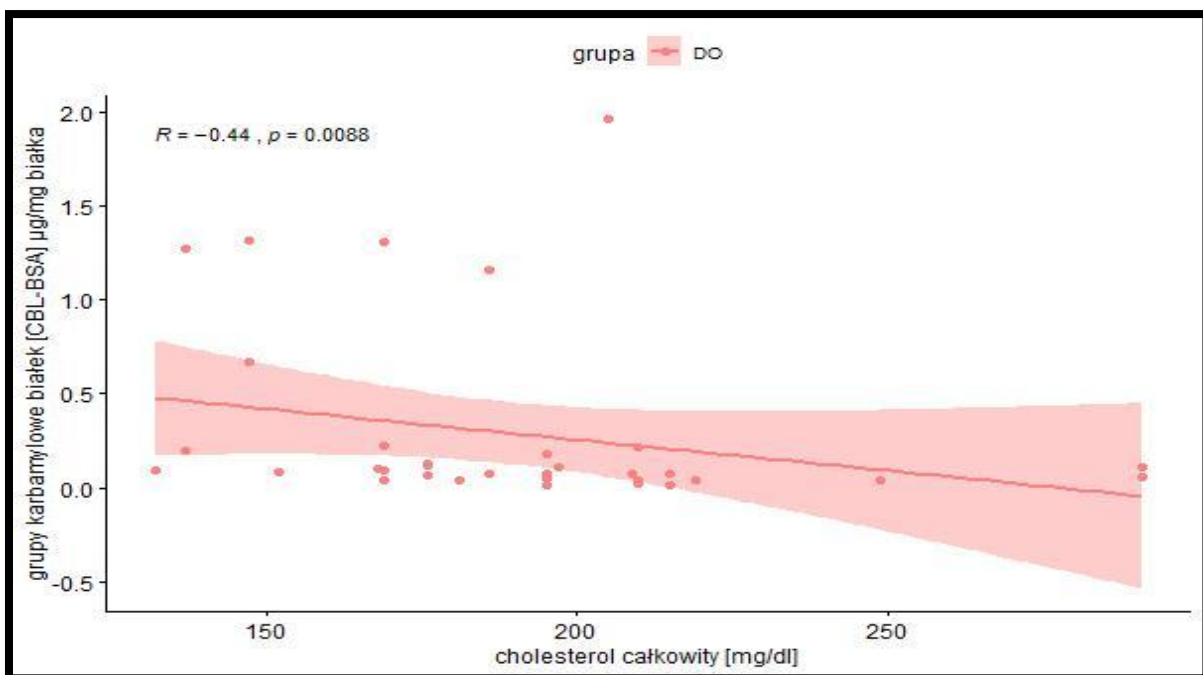
całkowitego, a dodatnią – od wartości UIBC. Zależności pomiędzy stężeniem grup karbamylowych białek a wybranymi parametrami laboratoryjnymi przedstawiono na rycinach 77-80 (ryc.77-80).



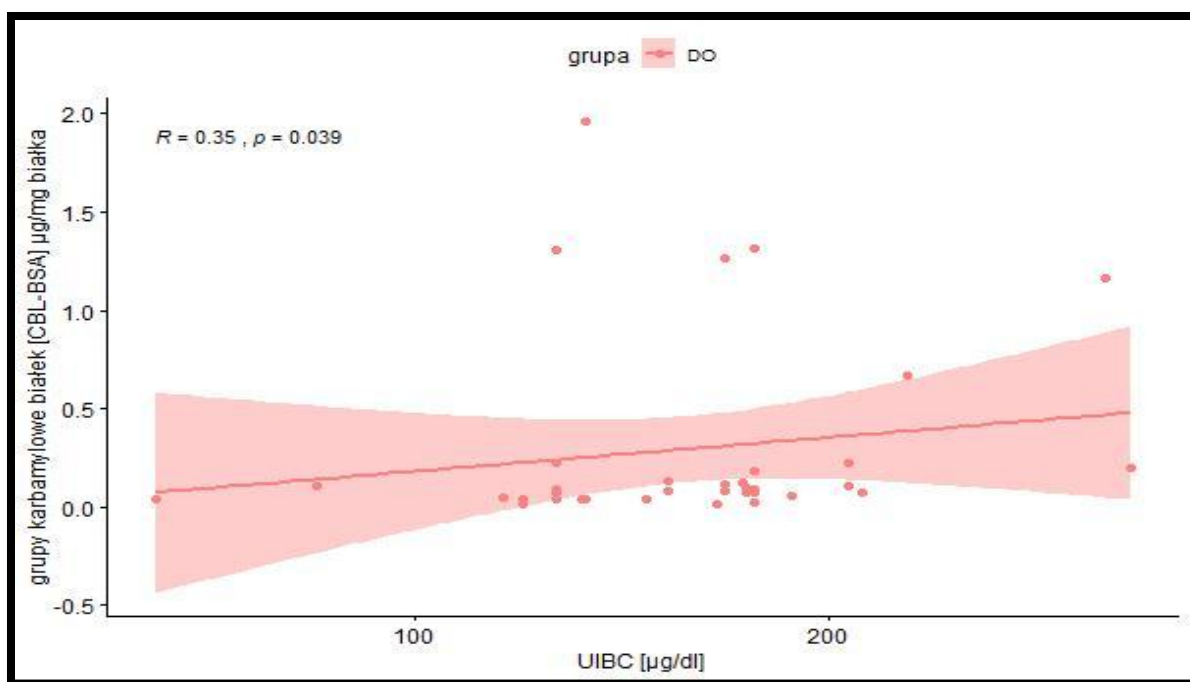
Ryc. 77. Zależność pomiędzy stężeniem grup karbamylowych białek a stężeniem kreatyniny w grupie PRE.



Ryc. 78. Zależność pomiędzy stężeniem grup karbamyłowych białek a stężeniem mocznika w grupie PRE.



Ryc. 79. Zależność pomiędzy stężeniem grup karbamyłowych białek a stężeniem cholesterolu całkowitego w grupie DO.



Ryc. 80. Zależność pomiędzy stężeniem grup karbamylowych białek a wartością UIBC w grupie DO.

Zależności pomiędzy stężeniem grup karbamylowych białek a ocenianymi parametrami laboratoryjnymi, dla których zależności te były statystycznie istotne, przedstawiono w tabeli 21 (Tabela 21).

Tabela 21. Wyniki testu korelacji dla grup karbamylowych białek i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne

	Korelacje			
	r	p*	test korelacji	siła korelacji
	PRE (n=48)			
mocznik [mg/dl]	-0,401336	0,004696181	Spearman	umiarkowana
kreatynina [mg/dl]	-0,3017209	0,03714871	Spearman	umiarkowana
	DO (n=35)			
UIBC [µg/dl]	0,3508804	0,0387651	Spearman	umiarkowana
cholesterol całkowity [mg/dl]	-0,4364004	0,008770494	Spearman	umiarkowana

\*Wyróżniono wartość p, gdy różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne, przy założeniu poziomu istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ .

## **5. DYSKUSJA**

### **5.1. WYKŁADNIKI OCENIANYCH MODYFIKACJI BIAŁEK W PRZEWLEKŁEJ CHOROBY NEREK**

#### **5.1.1. AOPPs W PRZEWLEKŁEJ CHOROBY NEREK**

W obecnym badaniu stwierdzono znaczącą różnicę w stężeniu AOPPs pomiędzy chorymi w okresie SNN a badanymi o prawidłowej funkcji nerek, przy równoczesnym braku różnicy pomiędzy grupą chorych z co najmniej pojedynczym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie a grupą zdrowych. Sugeruje to istotny udział upośledzenia funkcji nerek w kumulacji AOPPs. Równocześnie w żadnej z grup pacjentów nefrologicznych nie zaobserwowano korelacji pomiędzy stężeniem AOPPs a stężeniem kreatyniny i mocznika oraz wartością eGFR, co wskazuje na prawdopodobny udział w kumulacji AOPPs innych czynników, niezwiązanych z nagromadzeniem w ustroju produktów przemiany materii.

W klasycznych pracach Witko-Sarsat et al. stężenie AOPPs wzrastało wraz z postępem PChN. U pacjentów z klirensiem kreatyniny 20-40 ml/min stwierdzono wzrost o 18-21% w porównaniu do chorych o klirensie równym 41-80 ml/min. Maksymalna kumulacja AOPPs występowała przy spadku klirensu poniżej 20 ml/min – w tej grupie stężenie AOPPs rosło o ponad 70% w porównaniu do grupy o klirensie 41-80 ml/min [46]. Późniejsze prace także przedstawiają znaczący statystycznie wzrost stężenia AOPPs u pacjentów w SNN [118-120]. Jedynie Fragedaki et al. nie wykazali istotnych statystycznie różnic w stężeniu AOPPs pomiędzy osobami zdrowymi a grupą hemodializowanych [121]. Tym niemniej należy pamiętać, że praca ta obejmowała niewielką liczbę badanych (25 pacjentów dializowanych) o krótszym czasie dializoterapii, niż w pozostałych pozostałych badaniach.

Jeden z elementów różnicujących chorych w różnych stadiach zaawansowania PChN może stanowić diureza resztkowa, której wpływ na stężenie AOPPs, badali Furuya et al. W ich pracy spadek diurezy poniżej 300 ml na dobę wiązał się ze znacząco wyższym stężeniem AOPPs [122]. Obserwacje Gonzalez et al. nie potwierdziły wpływu diurezy resztkowej na stężenie AOPPs, ale badanie dotyczyło pacjentów podczas pierwszego roku leczenia nerkozastępczego metodą dializ otrzewnowych, tak więc badani charakteryzowali się stosunkowo dużą diurezą [268]. W rozprawie nie brano pod uwagę wpływu diurezy resztkowej na stężenie AOPPs.

W obecnym badaniu stężenie AOPPs w grupie chorych w okresie pre-dializacyjnym, czyli o niższym stopniu zaawansowania PChN, różniło się w sposób statystycznie istotny od stężenia AOPPs w grupach o prawidłowej funkcji nerek. Z kolei chorzy w okresie SNN nerek

prezentowali statystycznie wyższe stężenia AOPPs w porównaniu ze wszystkim badanymi grupami. Natomiast porównanie metod leczenia nerkozastępczego wykazało, że choć średnie stężenia AOPPs wydawały się być nieco wyższe w grupie hemodializowanych niż w grupie dializowanych otrzewnowo, to jednak nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy tymi grupami. Sugeruje to dominujący wpływ stopnia zaawansowania PChN w rozwoju stresu oksydacyjnego i gromadzeniu AOPPs, niezależnie od stosowanej techniki leczenia nerkozastępczego. Ward et al. udowodnili, że pojedyncza sesja hemodializy przy użyciu dializatorów typu high-flux nie powodowała spadku stężenia AOPPs, które utrzymywało się na wysokim poziomie, typowym dla pacjentów w SNN, zarówno przed hemodializą, jak i po hemodializie. Podobne wnioski wykazuje praca Kuchty et al. W odróżnieniu od aminotioli i mocznika, AOPPs, jako związki o stosunkowo dużej masie cząsteczkowej, nie mogą zostać usunięte w procesie dyfuzji ani konwekcji przez błonę dializatora. Ponadto stopień ich uszkodzenie przez RFT jest na tyle duży, że niemożliwe staje się odwrócenie oksydacyjnej modyfikacji. Dlatego też hemodializa nie zmniejsza kumulacji AOPPs u pacjentów w SNN [120, 124, 125]. Z kolei w pracy Wu et al. zaobserwowano, że w czasie hemodializy wzrost aktywności MPO łączy się ze wzrostem stężenia AOPPs. Wskazuje to na reakcję wybuchu tlenowego, przeprowadzaną przez komórki wielojądrzaste krwi obwodowej, jako źródło RFT i oksydacyjnego uszkodzenia białek. Tym niemniej należy zauważyć, że efekt ten dotyczył wyłącznie chorych dializowanych przy użyciu dializatorów z regenerowanej celulozy, które cechują się niską biogodnością. Dializatory polisulfonowe, które stosowane były również u pacjentów w obecnej pracy, powodowały mniejszy wzrost aktywności MPO, co przekładało się na brak istotnego wzrostu stężenia AOPPs po hemodializie w porównaniu do stężenia przed zabiegiem hemodializy [126].

Wpływ dializ otrzewnowych na kumulację AOPPs także badany był kilkakrotnie. Boulanger et al. zaobserwowali, że rozpoczęcie dializ otrzewnowych u pacjentów w stadium G5 PChN powodowało po 6 i 12 miesiącach leczenia spadek stężenia AOPPs, przy wzroście stężenia AGEs [127]. Wyniki interpretowano jako dowód na zdolność dializy otrzewnowej do zmniejszania stresu oksydacyjnego u pacjentów w SNN. Tym niemniej podobny spadek stężenia AOPPs u dializowanych otrzewnowo nie był opisywany w innych badaniach [45,123]. Część autorów wykazała, że stężenie AOPPs jest podwyższone wyłącznie u chorych w programie hemodializ, podczas gdy pacjenci leczeni dializą otrzewnową metodą CADO prezentują stężenia AOPPs porównywalne z osobami zdrowymi [128]. Jednak większość prac udowodniła, że AOPPs gromadzą się także u pacjentów dializowanych otrzewnowo, ale w niższych stężeniach niż w grupie hemodializowanych [129-132]. W rozprawie, choć



tendencja była podobna, ostatecznie nie wykazano istotnych statystycznie różnic w zakresie stężeń AOPPs w zależności od metody leczenia nerkozastępczego.

### **5.1.2. MG, CEL, CML, AGEs W PRZEWLEKLEJ CHOROBY NEREK**

Przy ocenie rozkładu stężeń wykładników modyfikacji białkowych w poszczególnych grupach w obecnych badaniach szczególną uwagę zwraca podobieństwo pomiędzy rozkładem stężenia MG i CEL oraz podobieństwo pomiędzy rozkładem stężenia CML i AGEs.

W przypadku MG i CEL zaobserwowano znaczące różnice pomiędzy poszczególnymi grupami badanych, z maksymalnymi wartościami średnich stężeń w grupie dializowanych otrzewnowo. Różnica pomiędzy rozkładem stężeń MG a rozkładem stężeń CEL dotyczyła jedynie grupy chorych z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie, która w przypadku oceny stężenia CEL nie różniła się od osób zdrowych, przeciwnie niż w przypadku oceny stężenia MG.

Z kolei rozkład stężeń CML i AGEs uwidoczniał maksymalne wartości średnich stężeń w grupie hemodializowanych. Znaczący był także fakt, że grupy chorych z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie i chorych w stadium G3b-G4 PChN oraz grupa dializowanych otrzewnowo nie wyróżniały się w sposób istotny w porównaniu do wszystkich pozostałych grup.

Reasumując, w przypadku MG znaczącą akumulację stwierdzono zarówno u chorych z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie, jak i u chorych w SNN, z maksymalną kumulacją w grupie dializowanych otrzewnowo. Kumulacja CEL dotyczyła głównie pacjentów w SNN, również z maksymalną kumulacją w grupie dializowanych otrzewnowo. Z kolei w przypadku CML i AGEs znacząca kumulacja obejmowała przede wszystkim chorych w SNN leczonych metodą hemodializ. Podobny rozkład zaobserwowano w pracy Machowskiej et al., gdzie oceniając gromadzenie AGEs, stwierdzono stopniowe narastanie ich stężenia, poczynając od stopnia G1 i G2 PChN aż do SNN. W tej ostatniej grupie najwyższe stężenia AGEs dotyczyły pacjentów w programie hemodializ, podczas gdy pozostali chorzy cechowali się niższymi stężeniami AGEs, niezależnie od tego czy byli leczeni dializami otrzewnowymi, czy należeli do grupy predializacyjnej [133].

Gromadzenie się AGEs w PChN jest wypadkową wielu procesów, obejmujących zaburzenia metaboliczne, nasilenie stresu oksydacyjnego i karbonylowego oraz czynniki jatrogenne związane z metodami leczenia nerkozastępczego. Kumulacja AGEs nie wynika wyłącznie ze spadku GFR i ubytku czynnych nefronów. Jednym z kluczowych czynników

jest zaburzenie równowagi pomiędzy tworzeniem i usuwaniem AGEs. W obecności RFT dochodzi do autooksydacji cukrów i nasilonej syntezy związków dikarbonylowych, które łatwo reagują z grupami aminowymi białek, co skutkuje nasiloną modyfikacją białek połączoną z produkcją AGEs. Z drugiej strony, obserwuje się utrudniony rozkład związków dikarbonylowych i białek, które uległy glikacji, co wynika z niedoboru glutationu i innych tiolowych antyoksydantów. Dodatkowo stwierdzono, że w warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do spadku ekspresji AGE-R1 i AGE-R2, które związane są z usuwaniem i rozkładem AGEs przez monocyty/makrofagi, natomiast obserwuje się regulację w górę receptorów RAGE [61, 63, 65].

Szereg badań opisuje gromadzenie AGEs u pacjentów poddawanych leczeniu nerkozastępczemu [121, 132, 135, 136, 137], przy czym w większości prac chorzy leczeni dializą otrzewnową charakteryzują się niższymi stężeniami AGEs, niż chorzy w programie hemodializ [129, 135, 138]. Podobną prawidłowość obserwuje się w przypadku związków dikarbonylowych [135, 139]. Należy jednak pamiętać, że zarówno związki diakarbonylowe, jak i AGEs, stanowią niezwykle heterogenną grupę, zarówno pod względem dróg syntezy, budowy chemicznej, stopnia związania z białkami, reaktywności, jak i dróg usuwania z ustroju. Rozbieżności pomiędzy poszczególnymi wykładnikami oksydacyjnych modyfikacji białek widoczne są także w obecnej pracy. Oceniając wyniki obecnego badania, należy zwrócić uwagę, że MG zaliczany jest do związków dikarbonylowych, które cechują się znaczną reaktywnością. Stężenie MG może ulegać szybszemu obniżeniu, niż stężenie CEL, CML i innych AGEs, gdyż łatwo wchodzi w reakcje z grupami aminowymi aminokwasów i białek. Z drugiej strony, MG jako związek diakarbonylowy związany jest silnie nie tylko ze stresem oksydacyjnym, ale i ze stresem karbonylowym, prowadzącym do stresu retikulum endoplazmatycznego, apoptozy i autofagii. Oba te procesy współlistnieją, napędzając się wzajemnie, ale niosą różne implikacje biochemiczne i kliniczne.

Znaczna dywergencja szlaków powstawania poszczególnych AGEs częściowo tłumaczy zróżnicowanie rozkładu stężeń wykładników ocenianych modyfikacji białek. Poszczególne węglowodany charakteryzują się różną zdolnością wchodzenia w reakcję z grupami aminowymi. Fruktaza jest bardziej reaktywna od glukozy, a metabolity fruktozy (fruktozo-6-fosforan, aldehyd 3-fosfo-glicerynowy) również cechuje znaczna reaktywność. Różne jest także powinowactwo związków zawierających grupę karbonylową do reszt aminokwasowych: cukry łatwiej wchodzi w reakcję z lizyną, a związki dikarbonylowe – z arginina. CML syntetyzowana jest w wyniku reakcji gliksalu z lizyną albo poprzez utlenienie produktu reakcji Amadori, może też powstawać w efekcie działania 3-

deoksyglukozonu na lizynę i przekształcenia końcowych produktów reakcji. Z kolei MG reagując z lizyną, daje CEL, co może tłumaczyć podobieństwo rozkładu stężeń tych związków w obecnej pracy. Do AGEs zalicza się też pyrrolinę, powstającą w wyniku reakcji 3-deoksyglukozonu z lizyną, pentozydynam, która jest produktem reakcji pentozy z resztą lizyny lub argininy, hydroimidazon, dimer glioksalu i lizyny (GOLD) oraz dimer metyloglioksalu i lizyny (MOLD) [58-60].

Technika leczenia nerkozastępczego wpływa na wysokość stężenia i rodzaj AGEs, które kumulują się w ustroju chorych w SNN. U osób hemodializowanych nie stwierdza się korelacji stężenia CML i pentozydynamy ze stężeniami fruktozolisizyny, produktu reakcji Amadori, który powstaje w warunkach hiperglikemii [63, 135]. Natomiast dializa otrzewnowa wiąże się z ekspozycją organizmu na wysokie stężenia glukozy, co prowadzi do powtarzających się epizodów hiperglikemii i sprzyja powstawaniu AGEs w ustroju. Dodatkowo sterylizacja płynów dializacyjnych w wysokiej temperaturze powoduje powstawanie produktów degradacji glukozy, które inicjują reakcje grup karbonylowych cukrów z grupami aminowymi reszt aminokwasowych białek, kwasów nukleinowych i fosfolipidów. Powstałe w ten sposób związki mogą ulec reabsorpcji z jamy otrzewnej do układu krążenia i układu limfatycznego [140].

Różnica w kumulacji AGEs pomiędzy hemodializowanymi a dializowanymi otrzewnowo może też być związana z odmienną budową błony, przez jaką dokonuje się proces dyfuzji i ultrafiltracji. W pracy Weiss et al., która objęła pacjentów z PChN oceniano stężenie pentozydynamy, CML, glioksalu, MG, glukozonu i 3-deoksyglukozonu. Zaobserwowano, że stężenie pentozydynamy było 15 do 25 razy wyższe u pacjentów dializowanych, niż u pacjentów z cukrzycą i proteinurią, przy czym maksymalna kumulacja dotyczyła chorych w programie hemodializ. Opisywane różnice najprawdopodobniej wynikały z wielkości porów stosowanej błony dializacyjnej. W błonie otrzewnej średnica porów wynosi 40 – 200 Å, co w badaniach wiązało się z niższymi stężeniami pentozydynamy u pacjentów dializowanych otrzewnowo. Wśród pacjentów hemodializowanych niższe stężenia pentozydynamy uzyskali ci, którzy leczeni byli z wykorzystaniem dializatorów polisulfonowych o średnicy porów 31 Å, niż chorzy, u których stosowano dializatory polisulfonowe o średnicy porów 14 Å. Odmienności tych nie wykazano w doniesieniu do CML – jej stężenie rosło 5 do 6-krotnie w grupie dializowanych [135].

Hemodializa również nie wykazuje jednakowej wydajności w oczyszczaniu osocza z poszczególnych AGEs. W badaniach Agalou et al. najmniejszy spadek stężenia w trakcie hemodializy dotyczył CEL i pentozydynamy, w odróżnieniu od CML, która była sprawnie

usuwana przez hemodializę [141]. Może to wynikać z różnego stopnia związania poszczególnych AGEs z białkami osocza i elementami strukturalnymi komórek.

Związok AGEs ze stresem oksydacyjnym w patogenezie PChN został opisany w wielu badaniach. Fragedaki et al. udowodnili, że stężenie CML rośnie u pacjentów hemodializowanych i koreluje z stopniem uszkodzenia materiału genetycznego limfocytów krwi obwodowej, definiowanym na podstawie testu mikrojądrowego. Zarówno stężenie AGEs, jak i częstość powstawania mikrojąder, obniżały się w przypadku pacjentów leczonych codzienną hemodializą w porównaniu z grupą o standardowej częstości hemodializy (3 x w tygodniu) [121]. Wpływ AGEs na DNA potwierdzają badania *in vitro*, w których opisano uszkodzenie DNA komórek nabłonka kanalików nerkowych świni po ekspozycji na CML i MG połączone z albuminą surowicy bydłowej (BSA). Ponieważ uszkodzenie DNA nie pojawiało się po potraktowaniu komórek proteazami, sugeruje się, że oddziaływanie AGEs i związoków dikarbonylowych na materiał genetyczny komórki jest reakcją, w której pośredniczą receptory błonowe, takie jak RAGE [142].

### **5.1.3. GRUPY KARBONYLOWE BIAŁEK W PRZEWLEKLEJ CHOROBI NEREK**

W obecnej pracy średnie stężenie grup karbonylowych białek stopniowo wzrastało, poczynając od grupy zdrowych, przez grupę chorych z PChN w stadium G3b-G4, następnie grupę dializowanych otrzewnowo, by osiągnąć maksimum w grupie hemodializowanych. Grupa pacjentów z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie prezentowała wyższe średnie stężenie grup karbonylowych białek, niż grupa zdrowych, ale niższe niż grupy nefrologiczne. Co więcej, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą pacjentów z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie a grupą chorych z PChN w stadium G3b-G4. Wskazuje to na znaczący udział zaawansowania PChN w nasileniu karbonylacji białek. W badaniach na kulturach komórek rdzenia wewnętrznego nerek myszy opisano, że wysokie stężenie mocznika nasila karbonylację białek, a równocześnie powoduje utlenienie DNA. Nie stwierdzono natomiast, aby modyfikacja białek była efektem przemiany mocznika do izocyjanianu i modyfikacji opartej na karbamylacji. Sugeruje to, że wysokie stężenie mocznika, typowe dla PChN, może nasilać karbonylację białek poprzez nasilenie produkcji RFT [143].

Istnieje szereg doniesień, opisujących gromadzenie się białek, które uległy karbonylacji, u pacjentów z PChN. Prace te dotyczą zarówno pacjentów hemodializowanych

[120, 144-148], jak i pacjentów w programie dializ otrzewnowych [147, 149, 150]. Pacjenci z PChN w okresie predializacyjnym również prezentują podwyższone stężenie grup karbonylowych, ale w mniejszym stopniu niż pacjenci leczenia nerkozastępczo [147-150]. W badaniu Mitrogianniego et al. karbonylacja narastała, poczynając od grupy zdrowych, poprzez grupę pacjentów predializacyjnych, osiągając maksimum w grupie hemodializowanych, a w grupie chorych dializowanych otrzewnowo stężenie grup karbonylowych w białkach osocza nie różniło się znacząco do osób zdrowych [148]. Z kolei w pracy Aveles et al. u pacjentów z PChN w stadiach G2-G5 stężenie grup karbonylowych korelowało z ubytkiem funkcji nerek [151]. Puchades et al. także porównywali stężenie grup karbonylowych, wykazując ich rosnącą koncentrację w grupach – kolejno – zdrowych ochotników, chorych predializacyjnych, chorych dializowanych otrzewnowo i chorych hemodializowanych [147]. Podobne, stopniowe narastanie zawartości grup karbonylowych w białkach osocza wraz z postępem uszkodzenia nerek, zaobserwowali Donate et al. [150].

W obecnej pracy spośród wszystkich grup nefrologicznych jedynie grupa hemodializowanych odróżniała się statystycznie istotnie na tle innych grup pod względem stężenia grup karbonylowych białek. Najwyższe średnie stężenie grup karbonylowych białek dotyczyło właśnie tej grupy pacjentów. Ward et al. udowodnili, że pojedyncza sesja hemodializy przy użyciu dializatorów typu high-flux powoduje wzrost liczby zredukowanych grup sulfhydrylowych i niewielki wzrost liczby grup karbonylowych. Dowodzi to, że hemodializa zmniejsza stres oksydacyjny poprzez usuwanie potencjalnych utleniaczy grup sulfhydrylowych, takich jak MG i aminotiole oraz mocznika, który stanowi substrat dla syntezy kwas izocyjanowego reagującego z grupami sulfhydryłowymi. Ponieważ tworzenie wiązań disiarczkowych w wyniku utleniania grup sulfhydrolowych jest reakcją odwracalną, tak więc po hemodializie obserwowano wzrost stężenia grup sulfhydrylowych. Wiadomo jednak, że karbonylacja białek nie może ulec prostemu odwróceniu, dlatego też stężenie grup karbonylowych nie ulegało obniżeniu, a wręcz przeciwnie – Ward et al. opisali nieduży wzrost, spowodowany nasileniem stresu oksydacyjnego na początku sesji hemodializy [49]. Część prac potwierdza obserwację Ward et al., dotyczącą wzrostu stężenia grup karbonylowych po zabiegu hemodializy [120, 152]. Jednak w badaniu Mayer et al. stężenie grup karbonylowych utrzymywało się na stałym, wysokim poziomie zarówno przed, jak i po hemodializie [153]. Autorzy tłumaczą to opóźnieniem w modyfikacji białek po hemodializie.

#### **5.1.4. sRAGE W PRZEWLEKŁEJ CHOROBY NEREK**

W obecnej pracy średnie stężenia sRAGE w poszczególnych grupach nie wykazywały znacznej dywergencji. Tym niemniej zaobserwowano statystycznie istotne różnice dotyczące pacjentów w SNN w porównaniu do grupy zdrowych i grupy z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie. Z kolei porównując grupy dializowanych otrzewnowo i hemodializowanych, nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w zakresie stężeń sRAGE pomiędzy grupami. W grupie chorych z PChN w stadium G3b-G4 stężenie sRAGE nie wykazywało statystycznie istotnej różnicy w porównaniu z grupą chorych z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie i z grupą zdrowych. Sugeruje to, że w przebiegu PChN dochodzi do kumulacji sRAGE dopiero na etapie SNN, niezależnie od stosowanej metody leczenia nerkozastępczego.

Szereg prac opisywało wzrost stężenia sRAGE w osoczu, zarówno w SNN, jak i na wcześniejszych etapach choroby [154-159]. W badaniu Semby et al. u badanych z wyjściowo prawidłowym eGFR podwyższone stężenie sRAGE i esRAGE stanowiło predyktor spadku eGFR w obserwacji rocznej [154]. Studium Semby et al. dotyczyło wyłącznie kobiet w wieku powyżej 65r.ż., ale jego obserwacje potwierdziły późniejsze badania Dalala et al., w których objęto sześćioletnią obserwacją kobiety i mężczyzn powyżej 65 r.ż. W tej grupie także wyjściowo podwyższone stężenie esRAGE wiązało się z wyższym ryzykiem rozwoju PChN [160].

Trudno jednoznacznie określić, czy wysokie stężenia sRAGE wynikają z patomechanizmu PChN i rozwoju jej powikłań, czy są jedynie konsekwencją spadku funkcji nerek. Rebholz et al. objęli obserwacją pacjentów, wśród których wyodrębniono grupę badanych o wyjściowo prawidłowej funkcji nerek ( $eGFR > 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ), a z których część rozwinęła PChN ( $eGFR < 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ ) lub rozpoczęła leczenie nerkozastępcze. Rebholz et al. wykazali korelację pomiędzy wyjściowym stężeniem sRAGE a ryzykiem rozwoju PChN i SNN, u chorych bez cukrzycy. Jednak po uwzględnieniu wartości eGFR wpływ wyjściowego stężenia sRAGE na występowanie PChN ulegał znaczącemu osłabieniu, a w przypadku SNN – do zerowej korelacji. Sugeruje to, że podwyższone stężenie sRAGE wynika bezpośrednio z zaburzenia funkcji nerek [156]. Potwierdza to praca Kalousovej et al. na grupie hemodializowanych, u których stężenie sRAGE korelowało negatywnie z diurezą resztkową [161].

Studium Kalousovej et al. udowodniło też, że poszczególne metody leczenia w różny sposób wpływają na gromadzenie sRAGE w ustroju [155]. U pacjentów dializowanych otrzewnowo sRAGE jest filtrowany przez błonę otrzewnej, a jego stężenie w dializacie koreluje zarówno ze stężeniem sRAGE w osoczu, jak i z nasileniem utraty białka do dializatu.

Z kolei u chorych w programie hemodializ stężenie sRAGE rośnie o 50% w czasie pierwszych piętnastu minut sesji hemodializy, a następnie ulega stopniowemu obniżeniu się, aż do końca hemodializy. Podobne zmiany w stężeniu sRAGE obserwowane są w czasie hemodiafiltracji. Tym niemniej nie odnotowano znaczącego wpływu techniki leczenia nerkozastępczego na sumaryczne stężenie sRAGE. Zarówno w badaniu Kalousovej et al. [155], jak i w pracy Isoyamy et al. [159], kumulacja sRAGE w jednakowym stopniu dotyczyła wszystkich chorych w SNN, zarówno hemodializowanych, jak i leczonych dializą otrzewnową. Podobnie w obecnej pracy nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą dializowanych otrzewnowo i hemodializowanych.

Oceniając stężenie sRAGE i jego znaczenie u chorych z PChN oraz powiązania z oksydacyjnymi modyfikacjami białek należy pamiętać, że ligandy sRAGE stanowią bardzo heterogenną grupę. Znajdują się wśród nich zarówno AOPPs, jak i AGEs. Udowodniono, że kumulacja AGEs skutkuje nasiloną ekspresją genu RAGE i zwiększoną obecnością RAGE na powierzchni komórek, w tym podocytów, komórek nabłonka kanalików nerkowych, komórek śródbłonna i mięśni gładkich naczyń, fibroblastów i komórek mezangium oraz monocytów/makrofagów [162-164]. Ponadto w SNN wzrost stężenia AGEs w osoczu jest silniej wyrażony niż wzrost stężenia sRAGE. W efekcie zwiększona obecność sRAGE w osoczu nie jest w stanie ochronić organizmu przed wzmożoną aktywacją RAGE i jej ogólnoustrojowymi skutkami. Prasad et al. sugeruje, aby posługiwać się raczej stosunkiem stężenia AGEs do sRAGE niż oceną stężenia AGEs, sRAGE i esRAGE [80]. Metoda ta wynika z hipotezy, która tłumaczy kumulację AGEs i sRAGE w miarę postępu PChN nie tylko spadkiem funkcji nerek, ale i wzmożoną syntezą AGEs i sRAGE. Nie rozstrzygnięto dotąd, jaki jest główny mechanizm wzrostu uwalniania sRAGE do osocza: czy jest to wzmożona ekspresja genu RAGE i syntezy esRAGE czy też nasilona synteza metaloproteinaz formujących cRAGE z cząsteczek RAGE na powierzchni komórek.

Ocena znaczenia stężenia sRAGE u pacjentów nefrologicznych i jego wpływu na odległe powikłania wymaga także uwzględnienia dodatkowych czynników, które oddziałują na stężenie sRAGE. Praca Kalousovej et al. podkreśla znaczenie polimorfizmu genetycznego genu RAGE u chorych hemodializowanych [161]. Znacząco wyższe stężenia sRAGE opisano u chorych z dwoma typami polimorfizmu: -429 T/C (wariant CC), który zlokalizowany jest w promotorze genu i wpływa na jego transkrypcję, oraz 2184 A/G (wariant GG), który dotyczy intronu 8. Szereg prac opisuje też wpływ leków na oś AGEs – RAGE – sRAGE. Udowodniono, że ekspresję genu RAGE zmniejszają leki hipotensyjne z grupy antagonistów receptora AT1 (telmisartan, kandesartan) i blokerów kanału wapniowego (nifedypina), leki

hipolipemizujące z grupy statyn (simwastatyna, atorwastatyna) oraz leki hipoglikemizujące z grupy biguanidów (metformina) i tiazolidynodionów (pioglitazon). Równocześnie wykazano, że inhibitory konwertazy angiotensynowej (perindopryl, ramipryl), statyny (atorwastatyna, fluwastatyna, lowastatyna) i metformina obniżają stężenie sRAGE [70].

Wraz ze spadkiem funkcji nerek nasilenie syntezy sRAGE oraz jego ligandów nakłada się z zaburzeniem usuwania z ustroju zarówno AGEs, jak i AOPPs. Każdy z tych procesów prowadzi do kumulacji sRAGE, co utrudnia określenie, który z mechanizmów dominuje w SNN.

### **5.1.5. 3-NITROTYROZYNA W PRZEWLEKŁEJ CHOROBIE NEREK**

W obecnej pracy stwierdzono kumulację 3-nitrotyrozyny u chorych z PChN, przy czym maksymalne gromadzenie 3-nitrotyrozyny dotyczyło pacjentów hemodializowanych. Średnie stężenie 3-nitrotyrozyny było wyższe w grupie dializowanych otrzewnowo, niż w grupie chorych z PChN w stadium G3b-G4, ale nie były to różnice istotne statystycznie. Podobnie nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą chorych z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie i grupą dializowanych otrzewnowo.

Większość badań potwierdziła gromadzenie się 3-nitrotyrozyny u pacjentów w SNN [93, 166-168], przy czym nitracja dotyczyła tych samych białek osocza, co u osób zdrowych [93, 168]. Odmienne wyniki uzyskali Massy et al., którzy oceniali stężenie pochodnych nitrowanych i nitrozylowanych u chorych hemodializowanych. O ile stężenie S-nitrozotolioli było znacząco wyższe w grupie hemodializowanych, o tyle nie wykazano różnicy w stężeniu 3-nitrotyrozyny pomiędzy grupą hemodializowanych i grupą zdrowych. Należy jednak zauważyć, że badanie Massy'ego et al. dotyczyło małej grupy pacjentów (22 hemodializowanych, 12 osób zdrowych) [169]. Z kolei Kose et al. oceniali stężenie 3-nitrotyrozyny u chorych leczonych różnymi technikami nerkozastępczymi. Tylko u pacjentów w programie hemodializ stwierdzono podwyższone stężenie 3-nitrotyrozyny, zarówno przed, jak i po zabiegu hemodializy. Natomiast u chorych dializowanych otrzewnowo stężenie 3-nitrotyrozyny nie różniło się od stężenia u zdrowych ochotników [167]. Prace Piroddiego et al. [93], Namiduru et al. [166] oraz Mitrogianni et al. [168] dotyczyły wyłącznie pacjentów hemodializowanych, u których stężenie 3-nitrotyrozyny było znacząco wyższe od stężenia u osób z grupy kontrolnej.

Dominacja grupy pacjentów hemodializowanych skłania do pytania o wpływ samej metody leczenia nerkozastępczego na rozwój stresu azotowego. W badaniu Mitrogianni et al.



nie wykazano różnic dotyczących stężenia 3-nitrotyrozyny przed i po dializie, niezależnie do typu stosowanego dializatora [168]. Jednak warto zauważyć, że jedną z możliwych dróg powstawania 3-nitrotyrozyny jest synteza przy udziale MPO, kluczowego enzymu wybuchu tlenowego. Wpływ PChN na aktywność i stężenie MPO nie został jednoznacznie ustalony. Część prac opisuje ujemną korelację stężeń MPO ze stężeniami mocznika i kreatyniny lub też prawidłowe stężenia MPO u chorych z PChN. Z drugiej strony, w grupie chorych leczonych nerkozastępczo opisywano wzrost stężenia i aktywności MPO [13]. Potwierdza to praca Namiduru et al., w której podwyższonemu stężeniu 3-nitrotyrozyny u chorych hemodializowanych towarzyszyło podwyższone stężenie MPO [166]. Bakillah et al. także wykazali, że po przeszczepie nerki spadek stężenia nitrowanej apolipoproteiny A-I (ang. *apolipoprotein apoA-I*, apoA-I) był związany ze spadkiem aktywności MPO [170]. Tak więc nasilenie reakcji wybuchu tlenowego związane z hemodializą może odpowiadać za kumulację 3-nitrotyrozyny w grupie chorych leczonych w programie hemodializ.

#### **5.1.6. GRUPY KARBAMYLOWE BIAŁEK W PRZEWLEKLEJ CHOROBY NEREK**

W obecnej pracy średnie stężenie grup karbamylowych białek najwyższe było w grupie zdrowych. Średnie stężenie grup karbamylowych było wyższe w grupie dializowanych otrzewnowo, niż w grupie hemodializowanych.

Szereg prac opisało powstawanie produktów karbamyłacji u pacjentów z PChN; zarówno u chorych pre-dializacyjnych [171-172], jak i leczonych nerkozastępczo [171, 173-175]. Za decydujący czynnik wpływający na nasilenie procesu karbamyłacji uznaje się długotrwałą kumulację mocznika w ustroju. Duże kontrowersje budzi jednak pytanie o relacje pomiędzy wykładnikami karbamyłacji i parametrami powszechnie wykorzystywanymi do oceny stanu klinicznego chorych z PChN. Badanie Davenporta et al. udowodniło, że u pacjentów w programie hemodializ stężenie karbamylowanej hemoglobiny koreluje odwrotnie proporcjonalnie ze wskaźnikiem redukcji mocznika (ang. *urea reductio ratio*, URR) oraz współczynnikiem Kt/V [176]. Ale późniejsza praca Tarifa et al. w długofalowej obserwacji wykazała, że stężenie karbamylowanej hemoglobiny lepiej odzwierciedla stężenie mocznika przed dializą niż wartość URR [177]. Wnioski te potwierdziła praca Kairaitis et al., w której stężenie karbamylowanej hemoglobiny korelowało ze stężeniem mocznika zarówno w grupie hemodializowanych, jak i dializowanych otrzewnowo, natomiast w obu grupach pacjentów nie zaobserwowano korelacji stężenia karbamylowanej hemoglobiny z URR, Kt/V

ani ze współczynnikiem katabolizmu białka (ang. *protein catabolic rate*, PCR) [178]. Z kolei Hasuike et al. udowodnili korelację stężenia karbamylowanej hemoglobiny ze stężeniem mocznika u chorych predializowanych [172]. W badaniu Tanga et al. obserwowano korelację stężenia homocytruliny związanej z białkami z funkcją nerek (ocenianą poprzez wartość eGFR i stężenie cytruliny) [179]. W pracy Berga et al. stężenie karbamylowanej albuminy rosło dwukrotnie w SNN w porównaniu do osób zdrowych, a jej stężenie korelowało wprost proporcjonalnie ze stężeniem mocznika [171].

Analiza opisanych powyżej prac demonstruje problem, który dotyczy w szerszym ujęciu całościowej oceny modyfikacji białek, a w szczególnym znaczeniu – oceny karbamyłacji. Podstawowym pytaniem staje się wybór adekwatnego markera, którego stężenie w osoczu odzwierciedla natężenie danego procesu w tkankach i komórkach. W opisanych powyżej badaniach oceniano stężenie karbamylowanej albuminy, karbamylowanej hemoglobiny oraz homocytruliny. Hemoglobina zalicza się do białek o długim okresie półtrwania (2 miesiące). Czas półtrwania albuminy jest krótszy – ok. 20 dni. Z kolei homocytrulina związana jest głównie z białkami o długim czasie półtrwania, gdyż grupa  $\epsilon$ -aminowa lizyny reaguje z kwasem izocyjanowym około 100 razy wolniej, niż grupy  $\alpha$ -aminowe. W obecnej pracy oceniano całościowo stężenie grup karbamyłowych lizyny w białkach osocza, co częściowo tłumaczy rozbieżności pomiędzy wynikami: stężenie grup karbamyłowych było wyższe w grupie zdrowych, niż w pozostałych grupach, w tym u chorych w SNN. Bailon et al. doszli do wniosku, że to stężenie karbamylowanej hemoglobiny – białka o czasie półtrwania równym 2 miesiące – odzwierciedla zmiany stężenia mocznika przed dializą, w odróżnieniu od białek o krótszym czasie półtrwania wynoszącym 3 tygodnie [175].

Kolejnym problemem związanym z oceną poszczególnych modyfikacji białkowych jest ograniczona dostępność reszt aminokwasowych wyeksponowanych na atak RFT, RFA i związków dikarbonylowych. Karbamyłacji łatwo ulegają reszty lizyny i reszty na N-końcach łańcucha polipeptydowego. S-nitrozylacja dotyczy głównie reszt metioniny i cysteiny, a nitracja – reszt tryptofanu i tyrozyny. Bezpośrednie oddziaływanie RFT na reszty proliny, kwasu glutaminowego i kwasu asparaginowego powoduje rozszczepienie wiązania peptydowego z wprowadzeniem grup karbonylowych. Utlenienie reszt lizyny, treoniny i argininy w obecności jonów metali przejściowych także prowadzi do karbonyłacji [74-75]. Reakcje glikooksydacji i lipooksydacji z udziałem związków dikarbonylowych również skutkują wprowadzeniem grup karbonylowych, głównie w resztach lizyny, cysteiny i histydyny [180]. Trzeba podkreślić, że modyfikacjom nie ulegają w tym samym stopniu

wszystkie reszty aminokwasowe danego typu w łańcuchu polipeptydowym. W poszczególnych białkach tylko niewielka część reszt aminokwasowych jest szczególnie narażona na atak RFT, RFA i związków dikarbonylowych.

W pracy Ationu A. udowodniono, że *in vitro* proces glikacji hemoglobiny pod wpływem glukozy hamuje proces karbamylicacji hemoglobiny pod wpływem mocznika, ponieważ obie modyfikacje dotyczą tej samej reszty waliny na N-końcu łańcucha  $\beta$  hemoglobiny [181]. Wnioski te potwierdzili Nicolas et al., którzy na modelach zwierzęcych nefropatii cukrzycowej zaobserwowali, że karbamylicacja albuminy stanowi kompetycyjny inhibitor glikacji. Co więcej, stwierdzono, że w warunkach niefizjologicznie wysokich stężeń kwasu cyjanowego dochodziło głównie do hamowania glikacji, natomiast przy niższych stężeniach – przeważał proces glikacji [182]. Z kolei w badaniach Zhang et al. na kulturach komórek rdzenia wewnętrznego nerek myszy opisano, że wysokie stężenie mocznika nasila karbonylację białek, a równocześnie powoduje utlenienie DNA. Nie stwierdzono natomiast, aby modyfikacje białek były efektem przemiany mocznika do izocyjanianu i modyfikacji opartej na karbamylicacji [143].

Rhode et al. opisali 17 form albuminy, obecnych w osoczu zdrowych ochotników, przy czym każda z form wykazywała specyficzne modyfikacje biochemiczne. W przypadku karboksylacji, karboksymetylacji, karboksyetylacji oraz karbamylicacji – dotyczyły one głównie tej samej formy K [183]. Wskazuje to na współzawodnictwo pomiędzy procesami stresu oksydacyjnego i karbonylowego oraz karbamylicacji. Trudno ocenić, których z danych typów reakcji przeważa u chorych z PChN, zwłaszcza że doświadczenia na hodowlach komórkowych i modelach zwierzęcych nie muszą przekładać się na badania *in vivo*, a obserwacje dotyczące kumulacji związków w strukturach nerki czy w ścianie naczyń – na stężenie tych samych związków w osoczu. Ocena wyników obecnej pracy skłania do uznania, że w PChN reakcje tworzenia AOPPs oraz reakcje glikacji, nitracji i karbonylacji przeważają nad reakcjami karbamylicacji, pomimo narastania stężenia mocznika w osoczu. Wskazuje to na zaburzenia równowagi redox – wynikające ze przewlekłego stanu zapalnego, niedożywienia, zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej i żelazowej – jako bardziej istotne źródło modyfikacji białkowych, niż kumulacja mocznika wynikająca ze spadku funkcji wydalniczej nerek. Ogniwo łączące karbamylicację ze stresem oksydacyjnym stanowi MPO, która w obecności  $H_2O_2$  katalizuje utlenianie tiocyjanianu, pochodzącego z pokarmów lub z dymu tytoniowego, do kwasu cyjanowego. Jednak ani Koeth et al. [174], ani Tang et al. [179] nie zaobserwowali korelacji pomiędzy stężeniem homocytruliny ( $\epsilon$ -amino-karbamylowanej lizyny) związanej z białkami a stężeniem MPO. Z kolei Shiu et al. opisali korelację stężenia

karbamylowanych LDL ze stężeniem MPO, niezależnie od stężenia mocznika [184]. Badanie dotyczyło wyłącznie pacjentów z cukrzycą typu 2, trudno więc definitywnie stwierdzić, czy u chorych nefrologicznych proces karbamyłacji lipoprotein przebiega w podobny sposób. Być może karbamyłacja dotyczy głównie białek cechujących się stosunkowo długim czasem półtrwania, które nie uległy innym modyfikacjom oksydacyjnym.

Z drugiej strony, w obecnej pracy do oceny stężenia grup karbamylowanych białek wykorzystano test ELISA. Uwodniono, że ocena glikacji w teście ELISA i spektroskopii masowej nie prowadzi do rozbieżnych wyników. Natomiast ocena karbamyłacji testem ELISA daje wyniki niższe niż te osiągnięte przy użyciu spektroskopii masowej [357,358]. Niższe stężenia białek karbamylowanych u chorych z PChN mogą też wynikać z niewielkiej liczby badanych grup. Trzeba również pamiętać o wpływie takich czynników, jak dym tytoniowy czy skład diety, które stanowią źródło tiocyjanianu jako substratu do syntezy kwasu cyjanowego.

W obecnej pracy średnie stężenie grup karbamylowanych białek w grupie chorych z PChN najwyższe było u pacjentów dializowanych otrzewnowo. Kalim et al. opisali, że rozpoczęcie leczenia metodą powtarzanych hemodializ wiąże się ze spadkiem stężenia karbamylowanej albuminy [186]. Perl et al. udowodnili, że intensyfikacja hemodializoterapii (wydłużenie sesji hemodializy z 3-4 godzin do 7-8 godzin) skutkuje spadkiem stężenia karbamylowanej albuminy, przy czym spadek stężenia karbamylowanej albuminy korelował ze spadkiem stężenia mocznika przed dializą [187]. Natomiast w badaniu Trottiera et al. porównywano grupę hemodializowanych z chorymi leczonymi dializą otrzewnową, stwierdzając, że pacjenci w programie dializ otrzewnowych cechują się wyższymi stężeniami karbamylowanej albuminy i wyższymi stężeniami mocznika. Przyczyną jest niższa efektywność dializy otrzewnowej w porównaniu z hemodializą. Trzeba też zaznaczyć, że większa kumulacja karbamylowanej albuminy dotyczy wszystkich pacjentów leczonych dializami otrzewnowymi, niezależnie od rodzaju stosowanych płynów dializacyjnych, chociaż w niektórych badaniach zaobserwowano trend do wyższych stężeń karbamylowanej albuminy u pacjentów stosujących płyny niskoglukozowe (z ikodekstryną i z wolnymi aminokwasami) [188].

### **5.1.7. PORÓWNANIE KUMULACJI WYKŁADNIKÓW OKSYDACYJNYCH MODYFIKACJI BIAŁEK U CHORYCH Z PRZEWLEKŁĄ CHOROBA NEREK I CHORYCH Z CO NAJMNIEJ 1 EPIZODEM SERCOWO- NACZYNIOWYM W WYWIADZIE**

Pacjenci z PChN w większości przypadków cechowali się wyższym średnim stężeniem wykładników oksydacyjnych modyfikacji białek, niż pacjenci z grupy z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie. Różnica ta była najsilniej zaakcentowana dla grupy HD. Grupa eS-N w przypadku części badanych wykładników oksydacyjnych modyfikacji białek (AOPPs, CEL, sRAGE) nie wykazywała różnicy pod względem stężenia danego związku w porównaniu do grupy zdrowych. Sytuacji takiej nie obserwowano w przypadku grupy chorych w SNN.

Miażdżyca jest jednym z najpoważniejszych powikłań PChN. Ryzyko chorób sercowo-naczyniowych rośnie wraz z narastającym uszkodzeniem nerek: spadek eGFR o 10 ml/min/1,73m<sup>2</sup> zwiększa ryzyko choroby sercowo-naczyniowej o 5%. W stadium G5 PChN choroby o etiologii miażdżycowej stanowią przyczynę aż 35-50% zgonów, a w grupie pacjentów dializowanych umieralność z przyczyn sercowo-naczyniowych rośnie dwudziestokrotnie w porównaniu z populacją ogólną [3]. Jednak – w odróżnieniu od populacji ogólnej – pacjenci nefrologiczni, którzy charakteryzują się małą masą ciała, niskim ciśnieniem skurczowym i niskim stężeniem cholesterolu, stanowią grupę o zwiększonej zapadalności na choroby sercowo-naczyniowe.

Zjawisko odwróconej epidemiologii dotyczy głównie chorych dializowanych, a jego przyczyną jest współwystępowanie dwóch grup czynników ryzyka miażdżycy. Do grupy czynników tradycyjnych zalicza się: wiek, płeć męską, nadwagę i otyłość, nikotynizm, małą aktywność fizyczną, dyslipidemię (wysokie stężenie LDL-cholesterolu, niskie stężenie HDL-cholesterolu, wysokie stężenie trójglicerydów), wysokie stężenia homocysteiny, fibrynogenu i lipoproteiny (a), nadciśnienie tętnicze oraz stan przedcukrzycowy i cukrzycę. Równolegle u pacjentów nefrologicznych pojawia się druga grupa zaburzeń sprzyjających miażdżycy, których dominacja nad czynnikami tradycyjnymi nasila się wraz ze spadkiem GFR. Nietypowe czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego obejmują: wzrost napięcia układu współczulnego, nasilenie stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego, działanie toksyn mocznicowych, niedożywienie białkowo-energetyczne, zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej, niedokrwistość, dysfunkcję śródbłonka i stan prozakrzepowy. Wraz z postępującym spadkiem GFR czynniki nietypowe przeważają nad czynnikami tradycyjnymi, czego efektem jest zjawisko odwróconej epidemiologii chorób sercowo-naczyniowych [205-207].

Oksydacyjne modyfikacje białek mogą wpływać na postępujące uszkodzenie układu krążenia u przebiegu PChN zarówno na drodze bezpośredniego uszkodzenia naczyń, jak i

nasilenia zaburzeń lipidowych i akceleracji formowania blaszek miażdżycowych. Modyfikacje białek oddziałują też na tworzenie zwapnień w obrębie ściany naczyniowej i zaburzenie równowagi pomiędzy czynnikami wazokonstrykcyjnymi i wazodilatacyjnymi. Opis wpływu poszczególnych wykładników modyfikacji białek na potencjalny rozwój zmian miażdżycowych u chorych z PChN przedstawiono w dalszej części dyskusji, wraz z opisem zależności i powiązań z parametrami laboratoryjnymi.

## **5.2. KORELACJE WYKŁADNIKÓW MODYFIKACJI BIAŁEK Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI W PRZEWLEKŁEJ CHOROBY NEREK**

### **5.2.1. OCENIANE MODYFIKACJE BIAŁEK A LABORATORYJNE WYKŁADNIKI NIEDOŻYWIENIA**

Jednym z najpoważniejszych powikłań PChN jest niedożywienie, które często towarzyszy zwiększonej zachorowalności na choroby układu sercowo-naczyniowego. Istnieje szereg przyczyn niedożywienia u pacjentów z PChN: obniżone łaknienie, zaburzenia wchłaniania wywołane przewodnieniem i obrzękiem błony śluzowej przewodu pokarmowego, utarta białka z moczem oraz utrata białka w czasie dializy. Tym niemniej, nawet przy prawidłowej podaży składników odżywczych, u znaczącej części chorych rozwijają się cechy niedożywienia, którego przyczynę stanowi przewlekły stan zapalny. Udowodniono, że w przebiegu przewlekłej choroby nerek dochodzi do wzmożonego wydzielania cytokin takich, jak IL-6 i TNF- $\alpha$  [189]. W efekcie obserwuje się wzrost spoczynkowego zużycia energii, prowadzący do nasilenia katabolizmu. Z drugiej strony, hipercytokinemii oddziałuje na przewód pokarmowy, gdzie spowalnia opróżnianie żołądka, oraz na ośrodkowy układ nerwowy, gdzie działa hamująco na ośrodek łaknienia i nasila zaburzenia depresyjne. Przewlekły stan zapalny prowadzi do zaburzeń gospodarki hormonalnej, obejmujących zaburzenia wydzielania hormonów takich jak somatostatyna, insulina i insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1) oraz grelina i adipokiny. U chorych w SNN stwierdza się także zaburzenie stosunku prozapalnej leptyny do przeciwzapalnej adiponektyny [190].

Za laboratoryjne wskaźniki niedożywienia u chorych z PChN uznaje się: obniżone stężenie białka całkowitego i albuminy oraz cholesterolu całkowitego i fosforanów. Obniżona masa mięśniowa u pacjentów niedożywionych odpowiada za spadek stężenia kreatyniny. Z kolei niskie spożycie białka objawia się spadkiem stężenia mocznika [189].

W obecnej pracy stwierdzono ujemną zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem białka całkowitego i albuminy oraz stężeniem kreatyniny i fosforanów. Zależności dotyczyły grupy dializowanych otrzewnowo oraz grupy chorych z PChN w stadium G3b-G4. Podobne zależności stwierdzono w stosunku do stężenia sRAGE – zaobserwowano ujemne zależności ze stężeniem białka całkowitego i albuminy oraz ze stężeniem kreatyniny, mocznika i cholesterolu całkowitego. Występowały one w grupie chorych dializowanych otrzewnowo oraz u chorych hemodializowanych i chorych z PChN w stadium G3b-G4. W przypadku stężenia grup karbamylowych białek stwierdzono ujemną zależność w stosunku do stężenia kreatyniny, mocznika i cholesterolu całkowitego; w grupie chorych dializowanych otrzewnowo oraz w grupie chorych z PChN w stadium G3b-G4. Stwierdzone tendencje w korelacji stężenia poszczególnych wykładników modyfikacji białek wskazują na możliwe powiązanie pomiędzy stresem oksydacyjnym a niedożywieniem u pacjentów z PChN. Szczególne znaczenie ma rozwój niedożywienia niezależnego od czynników dietetycznych, stanowiącego składową zespołu niedożywienie-zapalenie-miażdżyca (ang. *malnutrition-inflammation-atherosclerosis*, MIA). W tej grupie chorych niedożywienie towarzyszy zwiększonej zachorowalności na choroby sercowo-naczyniowe oraz szybkiemu postępowi miażdżycowego uszkodzenia narządów.

W pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego pomiędzy poszczególnymi składowymi zespołu MIA kluczową rolę wydaje się odgrywać czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B, który reguluje ekspresję genów cytokin prozapalnych. W warunkach fizjologicznych znajduje się on w cytozolu, w połączeniu z białkami inhibitorowymi (I $\kappa$ B). RFT wpływają na fosforylację i degradację I $\kappa$ B, co umożliwia uwolnienie czynnika NF- $\kappa$ B, transport do jądra i transkrypcję genów cytokin (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i  $\beta$ ), chemokin (MIP), cząstek adhezyjnych (VCAM-1, ICAM-1), immunoglobulin i enzymów (COX-2, fosfolipaza A2, lizozym). Udowodniono, że niektóre RFT, jak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aktywują czynnik NF- $\kappa$ B [28], tym niemniej należy wziąć pod uwagę, że NF- $\kappa$ B odpowiada także za transkrypcję genów enzymów antyoksydacyjnych, jak mitochondrialna SOD-2, a związek pomiędzy NF- $\kappa$ B, stresem oksydacyjnym i stanem zapalnym może być bardziej złożony [84-85]. Innym sugerowanym ogniwem łączącym stres oksydacyjny i zespół MIA jest inflamasom NLRP3, wewnątrzkomórkowy białkowy kompleks, którego działanie doprowadza do mobilizacji kaspaz tnących prekursorów IL-1 $\beta$  oraz IL-18. Aktywacja inflamasomu NLRP3 związana jest z wyciekaniem RFT z mitochondriów, co może wynikać zarówno z samej PChN, jak i chorób wyjściowo uszkadzających miąższ nerki (zapalenia kłębuszków, zapalenia cewkowo-śródmiąższowe) [191]. RFT mogą również powodować odłączenie białka TXNIP od

endogennego antyoksydantu – tioredoksyny, co umożliwia reakcję TXNIP z inflamasomem NLRP3 i aktywację kaskady prowadzącej do syntezy prozapalnych cytokin [191].

Pomiędzy oksydacyjnymi modyfikacjami białek a rozwojem niedożywienia istnieje też bezpośredni związek. W przebiegu PChN rozwija się oporność na insulinę o wieloczynnikowej etiologii. Jedną z przyczyn – oprócz zaburzeń metabolizmu witaminy D i kwasicy nieoddechowej oraz hipercytokinemii – stanowi stres oksydacyjny. W warunkach fizjologicznych po związaniu insuliny z receptorem dochodzi do autofosforylacji receptora oraz do fosforylacji białka IRS-1, co uaktywnia szlak kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K). Końcowy etap polega na fosforylacji kinazy białkowej 1 zależnej od fosfatydyloinozytolu (PDK1) oraz fosforylacji i aktywacji kinazy białkowej B (Akt/PKB). Aktywna kinaza białkowa B (Akt/PKB) odpowiada za m.in. za promowanie translokacji transportera GLUT4 do błony komórkowej, co umożliwia napływ glukozy do komórki. Przewaga cytokin prozapalnych skutkuje zaburzeniem przekazywania sygnału. Podstawowy mechanizm polega z jednej strony na hamowaniu fosforylacji białka IRS-1 przez TNF- $\alpha$ , a z drugiej strony – na syntezie supresora SOC-3 pod wpływem IL-6 [192]. W warunkach stresu oksydacyjnego produkcja RFT skutkuje hamowaniem autofosforylacji receptora insuliny i hamowaniem fosforylacji białka IRS-1, co sprzyja insulinoporności [192].

Niedożywienie dodatkowo pobudza karbamyłację białek poprzez spadek stężenia wolnych aminokwasów. Kwas izocyjanowy charakteryzuje się wyższym powinowactwem do wolnych aminokwasów, niż do reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym. Spośród wolnych aminokwasów najczęściej karbamyłacji ulega izoleucyna i treonina, natomiast najniższy wskaźnik karbamyłacji wykazują tyrozyna i fenyloalanina. Zarówno w pracy Berga et al. [171], jak i w studium Perla et al. [187] stężenie karbamyłowanej albuminy wykazywało odwrotnie proporcjonalną korelację ze stężeniem wolnych aminokwasów, przy braku powiązania ze współczynnikiem PCR. Na modelach zwierzęcych Berg et al. opisali hamujący wpływ na karbamyłację, jaki wywierało podawanie niektórych aminokwasów (cysteina, histydyna) i innych związków nukleofilowych (tauryna, cysteamina, glicylglicyna) [171]. Wpływ stężenia wolnych aminokwasów na karbamyłację potwierdziło badanie Kalima et al., w którym podawano dożylnie roztwór wolnych aminokwasów pacjentom w programie hemodializ. W efekcie zaobserwowano spadek stężenia karbamyłowanej albuminy, przy braku wpływu na stężenie mocznika przed dializą, stężenie albuminy i hemoglobiny [193]. Z kolei w badaniach Jin et al. udowodniono, że niedobór aminokwasów, głównie lizyny, oraz hipalbuminemia nasilają karbamyłację erytropoetyny i zmniejszają jej zdolność do stymulowania erytropoezy [194].



W obecnej pracy zależności pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a laboratoryjnymi wykładnikami niedożywienia dotyczyły pacjentów z PChN w stadium G3b-G4 oraz pacjentów dializowanych otrzewnowo. Niedożyczenie u chorych dializowanych otrzewnowo zależy od szeregu czynników: parametrów błony otrzewnej wpływających na typ transportu otrzewnowego i utratę albumin w trakcie dializy, natężenia lokalnego stanu zapalnego, objętości diurezy resztkowej oraz rodzaju stosowanych płynów dializacyjnych [182, 188]. Każdy z tych elementów może wpłynąć na nasilenie zespołu MIA. W obecnej pracy korelacja stężenia 3-nitrotyrozyny z laboratoryjnymi wykładnikami niedożywienia nie wystąpiła w grupie hemodializowanych. Ponieważ nie zaobserwowano, aby hemodializoterapia skutkowała znacząco rzadszym występowaniem zespołu MIA, trudno uznać za przyczynę lepszy stopień odżywienia i mniej nasilony stan zapalny u pacjentów w programie hemodializ. Potwierdza to rozkład parametrów laboratoryjnych: w obecnej pracy chorzy hemodializowani cechowali się wyższym średnim stężeniem CRP i niższym średnim stężeniem albuminy oraz białka całkowitego, niż pacjenci dializowani otrzewnowo i pacjenci w stadium G3b-G4 PChN. Ponadto stężenie sRAGE korelowało ujemnie ze stężeniem białka całkowitego, albuminy i mocznika nie tylko w grupie chorych predializacyjnych i chorych dializowanych otrzewnowo, ale również w grupie hemodializowanych. Trzeba więc uznać, że w grupie hemodializowanych nasilenie nitracji białek najprawdopodobniej zależało od innych czynników – takich jak wtórna nadczynność przytarczyc, skutkująca zależnością ze stężeniem PTH – niż u pacjentów dializowanych otrzewnowo i nie wykazywało tak znacznej korelacji z laboratoryjnymi wskaźnikami niedożywienia.

W przypadku karbamyłacji również nie stwierdzono żadnych istotnych korelacji w grupie hemodializowanych. Należy jednak zauważyć, że grupa hemodializowanych cechowała się niższym średnim stężeniem grup karbamyłowanych białek, niż grupa dializowanych otrzewnowo. Trottier et al. stwierdzili, że u chorych dializowanych otrzewnowo dochodzi do większej kumulacji karbamyłowanej albuminy, niż u chorych hemodializowanych, ze względu na niższą wydajność techniki leczenia nerkozastępczego [188]. W obecnej pracy pacjenci dializowani otrzewnowo cechowali się większym natężeniem karbamyłacji, co mogło wpływać na wystąpienie statystycznie istotnych korelacji z wykładnikami niedożywienia.

Obecne badania wykazały jedynie umiarkowaną ujemną zależność stężenia CEL ze stężeniem białka całkowitego i albuminy. Dotyczyła ona grupy pacjentów z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie oraz pacjentów z PChN w stadium G3b-G4. Jednak w całościowej analizie zaobserwowano, że chociaż obie te grupy od różnią

się grup chorych z SNN, to jednak nie stwierdzono istotnie statystycznej różnicy pomiędzy żadną z nich a grupą zdrowych.

Trudno jednoznacznie określić wpływ kumulacji poszczególnych związków zaliczanych do grupy AGEs na rozwój kluczowego dla PChN powikłania, jakim jest zespół MIA. W badania Schwedlera et al. oceniano kumulację AGEs o właściwościach fluorescencyjnych (AGEs-fl), do których zalicza się pentozydinę oraz, oddzielnie, stężenie CML, nieposiadającej zdolności do fluorescencji. Stwierdzono, że pacjenci z niższymi stężeniami AGEs-fl i niższymi stężeniami CML cechowali się wyższą śmiertelnością. Odmienne zachowywało się stężenie CRP, które wykazywało dodatnią korelację ze śmiertelnością chorych hemodializowanych. Co więcej, w grupie z wysokimi stężeniami CRP wyższa śmiertelność dotyczyła pacjentów, u których wysokiemu stężeniu CRP towarzyszyło niskie stężenie AGEs-fl i CML. Równocześnie zaobserwowano, że wysokie stężenia AGEs-fl oraz CML towarzyszyły wyższym stężeniom kreatyniny, mocznika i albuminy [137]. Może to tłumaczyć mniejszą śmiertelność w tej grupie chorych, ze względu na znaczny wpływ, jaki przypisuje się niedożywieniu w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych u chorych z PChN. Również w Busch et al. stwierdzili, że w dwuletniej obserwacji nie wykazuje się związku pomiędzy stężeniami AGEs a występowaniem incydentów sercowo-naczyniowych w grupie chorych predializacyjnych, chorych hemodializowanych i po przeszczepie nerki [195]. Machowska et al. zwracają także uwagę na pacjentów w SNN, którzy nie rozpoczęli jeszcze leczenia nerkozastępczego [133]. Być może w tej grupie pacjentów kumulacja AGEs gra znaczną rolę jako czynnik promujący choroby sercowo-naczyniowe, podczas gdy po rozpoczęciu dializ na pierwszy plan wysuwają się czynniki związane z przewodnieniem i stanem zapalnym.

## **5.2.2. OCENIANE MODYFIKACJE BIAŁEK A LABORATORYJNE WYKŁADNIKI STANU ZAPALNEGO**

Przewlekły stan zapalny stanowi jedną ze składowych zespołu MIA. Związek pomiędzy modyfikacjami białek, do których dochodzi w przebiegu PChN, a rozwojem zapalenia nie został jednoznacznie wyjaśniony. Duże wątpliwości budzi również pytanie o wybór odpowiedniego markera stanu zapalnego, który odzwierciedlałby hipercytokinię rozwijającą się wraz z postępem uszkodzenia nerek. W obecnej pracy nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniem CRP a stężeniem MG ani stężeniem żadnego z związków z grupy AGEs oraz AOPPs. W przypadku wartości WBC wyniki były rozbieżne. U pacjentów

w SNN stężenie AGEs wykazywało dodatnią umiarkowaną korelację z wartością WBC. W grupie chorych z PChN w stadium G3b-G4 stężenie CEL wykazywało zależność ujemną z wartością WBC, ale wartość zależności była umiarkowana, a ponadto grupa ta pod względem stężenia AGEs nie odróżniała się w sposób statystycznie istotny od grupy zdrowych.

Połączenie AOPPs lub AGEs z receptorem RAGE powoduje aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B i ekspresję genów cytokin prozapalnych (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i  $\beta$ ) oraz enzymów prozapalnych (COX-2, fosfolipaza A2). Wpływ interakcji AOPPs/RAGE i AGEs/RAGE nasila się, w dodatnim sprzężeniu zwrotnym, wraz z akumulacją ligandów RAGE w ustroju, która powoduje zwiększoną ekspresję receptora RAGE na powierzchni komórek, w tym podocytów, nabłonka kanalików nerkowych, komórek śródbłonka i mięśni gładkich naczyń, fibroblastów i komórek mezangium oraz monocytów/makrofagów [70, 162]. Jednym z czynników nasilających produkcję AGEs w grupie hemodializowanych jest dostęp naczyniowy. Weiss et al. opisali kumulację CML w obrębie neointimy przetok tętniczo-żylnych z naczyń własnych oraz w obrębie pseudointimy w przetokach politetrafluoroetylenowych. Odkładaniu CML towarzyszyła kumulacja takich substancji jak ET-1, PDGF oraz TGF- $\beta$ . Szczególnie nasilone odkładanie AGEs towarzyszyło histologicznym wykładnikom uszkodzenia i gojenia tkanek, co wskazuje na duży udział zapalenia w rozwoju stresu oksydacyjnego związanego z hemodializą [196]. Trzeba jednak zaakcentować różnice pomiędzy badaniami opartymi na ocenie lokalnego zapalenia a pracami, w których mierzone było osoczowe stężenie parametrów związanych ze stanem zapalnym.

W studiach Kalousovej et al. stężenie AGEs o właściwościach fluorescencyjnych (AGEs-fl), do których zalicza się pentozydny oraz stężenie samej pentozydny, nie korelowało ze stężeniem białek ostrej fazy (CRP, orozomukoid, fibrynogen) [197]. Badanie to objęło niewielką liczbę pacjentów (34 osoby) i dotyczyło wyłącznie osób hemodializowanych, ale podobne wyniki opisane zostały przez Sebekovą et al. W badaniach Sebekovej et al. w grupie 30 dzieci z PChN (w leczeniu zachowawczym, dializowanych i po przeszczepie nerki) nie stwierdzono powiązania pomiędzy stężeniem AGEs-fl i stężeniem CML, która zaliczana jest do AGEs pozbawionych właściwości fluorescencyjnych, a stężeniem CRP i cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-6) [136]. Podobny brak korelacji pomiędzy stężeniem AGEs-fl i stężeniem CML a stężeniem CRP opisali Schwedler et al. [137]. Z kolei w badaniu Machowskiej et al. w grupie SNN stężenie AGEs korelowało z nasileniem zapalenia (ocenianego przez stężenie CRP i IL-6) oraz ze śmiertelnością całkowitą i sercowo-naczyniową. Należy jednak zauważyć, że tym badaniu nie rozpatrywano całościowo AGEs-fl,

ale oceniano pentozydynamę, pojedynczy związek zaliczany do AGEs o zdolnościach fluorescencyjnych [133]. Z kolei wcześniejsze obserwacje Witko-Sarast et al. wykazały brak korelacji stężenia AOPPs ze stężeniem CRP, przy jednoczesnej korelacji ze stężeniem TNF- $\alpha$  i IL-6 [44-46]. W studium Kalousovej et al. dotyczącej chorych w programie hemodializ również nie wykazano korelacji stężenia AOPPs z stężeniem CRP, natomiast udało się wykazać korelację stężenia AOPPs ze stężeniem fibrynogenu i orozomukoidu [124].

Oceniając związek pomiędzy stanem zapalnym wyrażanym wartością WBC, stężeniem związków takich jak AOPPs i AGEs a techniką leczenia nerkozastępczego trzeba zauważyć, że w obecnej pracy średnie wartości WBC nie przekraczały granic wartości referencyjnych. U chorych w SNN dochodzi do zaburzenia funkcji układu odpornościowego, którego prawidłowe działanie objawia się m.in. wzrostem liczby leukocytów w ramach rozwijającego się stanu zapalnego. Deficyt odpowiedzi immunologicznej związany jest z nieprawidłowym dojrzewaniem limfocytów Th, wzrostem stosunku Th1/Th2, limfocytopenią B przy prawidłowym stężeniu immunoglobulin, zakłóceniem funkcji komórek prezentujących antygen oraz regulacją w górę receptorów zmiatających na komórkach fagocytyjnych [39]. Należy również zwrócić uwagę, że związek miejscowej kumulacji AGEs z lokalnym zapaleniem – opisywany w badaniach *in vitro* lub w preparatach pobranych z dostępów naczyniowych osób hemodializowanych – nie musi przekładać się na korelację między stężeniami wykładników modyfikacji białek i markerów stanu zapalnego w osoczu. Sugeruje się też, że AGEs i AOPPs mogą być związane nie z ostrą fazą zapalenia i uszkodzenia tkanek, ale raczej z odległymi skutkami długotrwałego stanu zapalnego, które rozwija się u pacjentów z PChN. Ponadto powstawanie AGEs jest pochodną nie tylko stresu oksydacyjnego, ale i stresu karbonylowego, który niesie ze sobą odmienne implikacje molekularne i cytologiczne. Z drugiej strony, trzeba pamiętać, że związek pomiędzy oksydacyjnymi modyfikacjami białek a stanem zapalnym jest wielopłaszczyznowy i powiązanie pomiędzy tymi dwoma procesami może przebiegać różnymi drogami, nieobejmującymi klasycznych cytokin prozapalnych takich jak TNF- $\alpha$  czy IL-6. I tak na przykład w pracach Uchimury et al. wykazano istotną korelację w grupie hemodializowanych pomiędzy stężeniem zarówno pentozydynamy, jak i CML, ze stężeniem dwóch cytokin prozapalnych: IL-18 i czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF) [198].

W obecnej pracy nie stwierdzono także zależności pomiędzy stężeniem grup karbonylowych a stężeniem CRP i wartością WBC. Ze względu na duże rozbieżności dotyczące stopnia oksydacyjnego uszkodzenia poszczególnych białek osocza trudno ocenić

bezpośredni wpływ karbonylacji na rozwój stanu zapalnego i zespołu MIA u chorych z PChN. W badaniu Dahwa et al. nie wykazano korelacji pomiędzy takimi wykładnikami stresu oksydacyjnego, jak grupy karbonylowe i F2-izoprostany, a czynnikami klinicznymi, przyjmowanymi lekami i suplementacją antyoksydantów [199]. Natomiast Danielski et al. opisali, że w grupie hemodializowanych wyższe stężenia grup karbonylowych dotyczyły pacjentów z hipoalbuminemią, niż chorych o prawidłowym stężeniu albuminy [200]. Guo et al. opisali zależność pomiędzy podwyższonym stężeniem grup karbonylowych a podwyższonymi stężeniami CRP oraz obniżonymi stężeniami jonów cynku oraz seleniu [201]. Podobną zależność pomiędzy stężeniem grup karbonylowych a stężeniem białek ostrej fazy (CRP, fibrynogen) wykazali Aveles et al. Powiązanie to było obecne u pacjentów w różnych stadiach zaawansowania PChN (od G2 do G5) [151]. W obecnej pracy nie wykazano zależności pomiędzy stężeniem grup karbonylowych białek a stężeniem CRP, wartością WBC, stężeniem HbG ani stężeniem albuminy oraz białka całkowitego. Być może związane było to z niewielką liczebnością grup oraz prawidłowym stężeniem poszczególnych parametrów w grupach chorych z PChN. Z pewnością problem powiązania karbonylacji białek z przewlekłym stanem zapalnym wymaga dalszych badań.

W obecnej pracy nie stwierdzono również zależności stężenia 3-nitrotyrozyny i stężenia grup karbonylowych białek od stężenia CRP ani od wartości WBC. Obserwacje Massy'ego et al. potwierdzają brak zależności pomiędzy wykładnikami stresu azotowego – związanymi zarówno z nitrozylacją, jak i z nitracją – ze stężeniem CRP [169]. Z kolei hipoteza o znaczącym udziale stanu zapalnego jako ogniwa łączącego karbonylację ze śmiertelnością chorych nefrologicznych również nie znalazła potwierdzenia w badaniach. Ani w studium Koetha et al. [174], ani w badaniu Tanga et al. [179] nie wykazano korelacji pomiędzy stężeniem homocytruliny ( $\epsilon$ -amino-karbonylowanej lizyny) związanej z białkami a stężeniem MPO, kluczowego enzymu wybuchu tlenowego.

W obecnych badaniach nie zaobserwowano także zależności pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem CRP i wartością WBC. Oddziaływanie przewlekłego stanu zapalnego na kumulację sRAGE było przedmiotem intensywnych badań w wielu pracach [81, 202]. Jung et al. nie zaobserwowali związku pomiędzy stężeniem sRAGE u chorych leczonych hemodializami a stężeniem CRP oraz IL-6 [203]. Natomiast Kalousova et al. wykazali negatywną korelację stężenia sRAGE u pacjentów hemodializowanych ze stężeniem wykładników stanu zapalnego (fibrynogen, orozumkoid, WBC), przy braku powiązania ze stężeniem CRP [161]. W pracy Kima JK. et al. wysokość stężenia sRAGE u chorych w programie dializ otrzewnowych była odwrotnie proporcjonalna do stężenia CRP i IL-6,

podczas gdy stężenie ligandu RAGE – białka S100A12 (EN-RAGE), zaliczanego do grupy S100/kalgranulin, rosło wprost proporcjonalnie do stężenia CRP i IL-6 [158]. Brak stymulującego wpływu zapalenia na kumulację sRAGE w PChN potwierdzają badania, które objęły większą liczbę pacjentów, w tym zarówno chorych predializacyjnych, jak i chorych leczonych nerkozastępczo. Nakashima et al. zaobserwowali, że stężenie sRAGE koreluje negatywnie ze stężeniem markerów stanu zapalnego takich jak CRP, fibrynogen i orozomukoid [204], a Isoyama et al. opisali brak związku pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem CRP [159]. Obserwacje Koyamy et al. wykazały jedynie słabą korelację stężenia CRP ze stężeniem esRAGE u pacjentów z prawidłowym GFR [81] oraz brak podobnej korelacji dla pacjentów w SNN [202]. Negatywna korelacja sRAGE z niektórymi białkami ostrej fazy sugeruje, że sRAGE podlega podobnym prawidłowościom u pacjentów z PChN, jak w populacji ogólnej, w której niższe stężenia sRAGE wiążą się z rozwojem stanu zapalnego.

### **5.2.3. OCENIANE MODYFIKACJE BIAŁEK A ZABURZENIA GOSPODARKI LIPIDOWEJ**

Dyslipidemia, pojawiająca się wraz z postępowaniem PChN, charakteryzuje się hipertrójglicydemią, spadkiem stężenia HDL-C i apoA-I, z równoczesnym wzrostem stężenia lipoprotein o pośredniej gęstości (ang. *intermediate density protein*, IDL) i remnantów chylomikronów oraz obniżonym stosunkiem apolipoproteiny C-II (ang. *apolipoprotein C-II*, apoC-II) /apolipoproteiny C-III (ang. *apolipoprotein C-III*, apoC-III). Przyczyną nieprawidłowego profilu lipidowego jest zakłócenie obiegu cholesterolu i trójglicerydów w ustroju, które doprowadza do miażdżycowego uszkodzenia narządów. Proces dojrzewania uwalnianych z wątroby lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL) oraz chylomikronów powstających w jelitach ulega zaburzeniu ze względu na niedobór HDL<sub>2</sub>, które fizjologicznie dostarczają apolipoproteiny C (ang. *apolipoprotein C*, apoC) i apolipoproteiny E (ang. *apolipoprotein E*, apoE) do VLDL i chylomikronów. Z kolei w tkance mięśniowej i tłuszczowej dochodzi do regulacji w dół receptora dla VLDL oraz spadku aktywności lipazy lipoproteinowej obecnej w śródbłonku naczyń. Następstwem tych deficytów jest hamowanie hydrolizy trójglicerydów i uwalniania z VLDL wolnych kwasów tłuszczowych, które u osób zdrowych są wykorzystywane przez adipocyty i mioocyty [208]. Spadek aktywności lipazy lipoproteinowej upośledza również hydrolizę chylomikronów w tkance tłuszczowej i mięśniowej. W warunkach fizjologicznych remnanty VLDL, IDL,

ulegają przemianie do LDL, pod wpływem esterazy cholesterolowej i białka przenoszącego estry cholesterolu (ang. *cholesteryl ester transfer protein*, CETP) oraz lipazy wątrobowej. Enzymy te umożliwiają wzbogacenie cząsteczek IDL w estry cholesterolu i pozbycie się trójglicerydów. W PChN następuje spadek aktywności lipazy wątrobowej; ponadto niedobór HDL<sub>2</sub> dodatkowo utrudnia prawidłowe wzbogacenie IDL w cholesterol [209]. Z kolei regulacja w dół wielofunkcyjnego receptora LRP, obecnego na komórkach wątroby, uniemożliwia prawidłowe usuwanie pozostałej części IDL. Receptor LRP jest także odpowiedzialny za oczyszczanie krwi z remnantów chylomikronów, tak więc jego deficyt powoduje gromadzenie się zarówno IDL, jak i remnantów chylomikronów [210]. Stres oksydacyjny przyczynia się do wystąpienia dyslipidemii, przy czym szczególną rolę zdaje się odgrywać MPO, odpowiedzialna za oksydacyjne modyfikacje lipoprotein [13]. Syntetyzowany przez MPO HOCl reaguje z resztami tyrozynowymi apolipoproteiny-B100 (ang. *apolipoprotein B-100*, apo-B100), w wyniku czego zmieniona cząstka LDL łączy się z miażdżycorodnym receptorem LOX-1 [211]. Innym produktem działania MPO jest kwas cyjanowy, którego tautomer – kwas izocyjankowy – wchodzi w reakcje z grupami aminowymi apolipoprotein. W rezultacie powstają karbamylowane cząstki LDL, rozpoznawane przez receptory SR komórek fagocytyujących [212]. MPO odpowiada także za syntezę RFA, a nitrowane pochodne LDL wiążą się z receptorem CD36, co zapoczątkowuje przemianę monocytów/makrofagów w komórki piankowe [213].

Zaburzeniom metabolizmu LDL towarzyszą nieprawidłowości HDL, które zmniejszają skuteczność ich działania przeciwmiażdżycowego i przeciwutleniającego. W przebiegu PChN zaobserwowano spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych, stanowiących składowe HDL: paraoksonazy i GPx [209]. Paraoksonaza występuje w trzech izoformach, z których dwie (PON-1 i PON-3) znajdują się w HDL. Sugeruje się, że substratem dla PON-1 są miażdżycorodne laktony, choć nie zostało to w pełni dowiedzione. Natomiast wykazano, że enzym ten jest odpowiedzialny za hamowanie peroksydacji lipidów, usuwanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz usuwanie cholesterolu z monocytów/makrofagów. Spadek aktywności PON-1 u pacjentów z PChN wynika nie tylko z zaburzenia metabolizmu HDL, ale i z bezpośredniego inaktywującego wpływu toksyn mocznicowych i produktów działania RFT takich jak AGEs [214]. Nasilony atak RFT powoduje również oksydacyjne modyfikacje apoA-I, które zmniejszają powinowactwo HDL<sub>3</sub> do transportera ABCA1, odpowiedzialnego za przekazywanie cholesterolu z komórek do HDL<sub>3</sub>. Z kolei spadek syntezy wątrobowej syntazy acylotransferazy lecytyna:cholesterol (ang. *lecithin: cholesterol acyltransferase*, LCAT) powoduje niedobór tego enzymu w cząsteczkach HDL<sub>3</sub>. RFT również mogą

bezpośrednio inaktywować LCAT – udowodniono, że MPO powoduje, poprzez tworzenie 3-chlorotyrozyny, spadek aktywności LCAT w HDL [210]. Deficyt aktywności LCAT utrudnia przemianę HDL<sub>3</sub>, zawierającego wolny cholesterol, do bogatego w estry cholesterolu HDL<sub>2</sub>, który rozpoznawany jest przez receptor SR-BI na powierzchni hepatocytów. W fizjologicznych warunkach HDL umożliwiają przekazywanie cholesterolu z tkanek obwodowych do wątroby. Proces ten, określany jako wsteczny transport cholesterolu, w PChN zostaje zahamowany. Zamiast tego następuje endocytoza i degradacja ubogolipidowych HDL<sub>3</sub> w hepatocytach za pośrednictwem łańcucha  $\beta$  syntazy ATP [208]. Zmodyfikowane HDL, podobnie jak ox-LDL, wpływają negatywnie na komórki śródbłonna: obserwuje się wzrost ekspresji cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1 oraz hamowanie aktywności eNOS, co prowadzi do rozwoju zapalenia i formowania zmian miażdżycowych [208].

Ważną rolę w rozwoju miażdżycy u pacjentów z PChN odgrywają receptory SR, których ekspresja wyraźnie rośnie wraz ze spadkiem GFR [215]. Ox-LDL nie są rozpoznawane przez fizjologiczne receptory na powierzchni hepatocytów, natomiast wykazują zwiększone powinowactwo do SR-A1, SR-A2, SR-BI oraz CD-36 [120]. Akumulacja ox-LDL w komórkach fagocytujących skutkuje uszkodzeniem enzymów łańcucha oddechowego i nasilonym wyciekaniem RFT z mitochondriów, co wtórnie nasila stres oksydacyjny. Wychwyty ox-LDL nie podlega regulacji zależnej od stężenia cholesterolu, w wyniku czego obserwuje się przeładowanie monocytów/makrofagów cholesterolu. Tracą one mobilność i ulegają przemianie do komórek piankowatych, które tworzą nacieczenie tłuszczowe ściany naczynia. Finalnym następstwem akumulacji ox-LDL jest apoptoza komórek piankowatych z uwolnieniem cholesterolu, w wyniku czego dochodzi do formowania rdzenia martwiczego-lipidowego blaszki miażdżycowej [216].

W obecnym badaniu stwierdzono silną ujemną zależność pomiędzy stężeniem AOPPs a stężeniem HDL-cholesterolu. Dotyczyła ona grupy dializowanych otrzewnowo. Podobną zależność opisano w pracy Marques de Mattos et al., w której stężenia AOPPs korelowały ze spadkiem stężenia HDL-cholesterolu [128]. Udowodniono, że AOPPs ze względu na duże powinowactwo do SR-BI współzawodniczą z HDL<sub>2</sub> o wiązanie z tym receptorem na hepatocytach. Powodują też zmniejszenie ekspresji genu transportera ABCA1, odpowiedzialnego za przekazywanie cholesterolu z komórek do HDL<sub>3</sub>. Zaburzenie metabolizmu HDL i wstecznego transportu cholesterolu promuje tworzenie komórek piankowatych i tworzenie blaszek miażdżycowych w układzie krążenia [219]. AOPPs wpływają na śródbłonek za pośrednictwem zarówno RAGE, jak i receptorów SR jak np. SR-



BI [217-218]. Przyczynia się to do rozwoju lokalnego stanu zapalnego, przewagi czynników prozakrzepowych i uszkodzenia ściany naczyń, które stanowi pierwszy etap rozwoju zmian miażdżycowych [217]. Spadek stężenia HDL-cholesterolu może stanowić ogniwo łączące AOPPs – jako wykładnik oksydacyjnych modyfikacji białek – z miażdżycowymi powikłaniami PChN. Należy jednak zauważyć, że w obecnych badaniach korelacja dotyczyła wyłącznie chorych dializowanych otrzewnowo, którzy charakteryzowali się wyższym średnim stężeniem HDL-cholesterolu, niż pozostali pacjenci z grup nefrologicznych.

Znaczenie AOPPs w powikłaniach miażdżycowych PChN opisywano w szeregu prac, jednak nie zostało ono w pełni wyjaśnione. W badaniach Kocak et al. u chorych dializowanych otrzewnowo stężenie AOPPs korelowało ze stopniem dysfunkcji śródbłonna, ocenianej jako rozszerzenie naczyń pod wpływem azotanu [131]. Na modelach zwierzęcych Liu et al. przedstawili, że podawanie AOPPs powoduje szybsze tworzenie blaszek miażdżycowych z naciekiem komórek piankowatych i proliferacją komórek mięśni gładkich naczyń [220]. W badaniu Descamps-Latscha et al. już u pacjentów z GFR 20-40 ml/min/1.73m<sup>2</sup> incydenty sercowo-naczyniowe – definiowane jako zaburzenia krążenia wieńcowego, mózgowego lub obwodowego – pojawiały się częściej u chorych z wyższymi stężeniami CRP, fibrynogenu i AOPPs [221]. Z kolei Zhou et al. opisali związek pomiędzy podwyższonymi stężeniami AOPPs a chorobą niedokrwienną serca, który dotyczył tylko grupy hemodializowanych, z wyłączeniem dializowanych otrzewnowych i chorych w okresie predializacyjnym [130]. Przeciwnie w badaniach Gonzaleza et al., które objęły pacjentów w programie dializ otrzewnowych i w których wykazano powiązanie pomiędzy AOPPs a chorobami sercowo-naczyniowymi. Jednak związek ten nie był prostą zależnością – Gonzalez et al. opisali korelację pomiędzy wzrostem stężenia AOPPs w ciągu pierwszego roku od rozpoczęcia dializ otrzewnowych a występowaniem chorób sercowo-naczyniowych, zarówno w przeszłości, jak i w dalszej obserwacji [132]. Kilkukrotnie badano również powiązanie pomiędzy stężeniem AOPPs a wskaźnikiem „intima media” określającym grubość błony środkowej i wewnętrznej w tętnicy szyjnej wspólnej (ang. *common carotid artery intima-media thickness*, CCA-IMT), który jest powszechnie wykorzystywanym parametrem odzwierciedlającym wczesne zmiany miażdżycowe. U chorych w programie hemodializ Drüeke et al. stwierdzili pozytywny związek pomiędzy stężeniem AOPPs a wskaźnikiem CCA-IMT, przy czym korelacja ta była niezależna od innych czynników takich jak stężenie CRP i ferrytyny [222]. Podobną korelację opisał Kocak et al. także u pacjentów dializowanych otrzewnowo [132].

W obecnej pracy wykazano również silną zależność pomiędzy stężeniem LDL-cholesterolu a stężeniem 3-nitrotyrozyny. Stres azotowy może przyczynić się do uszkodzenia układu sercowo-naczyniowego poprzez modyfikacje poszczególnych apolipoprotein, co zakłóca prawidłowy obieg cholesterolu w ustroju. Udowodniono, że nitracja związanej z LDL apo-B100 oraz związanej z HDL apoA-I przyspiesza formowanie blaszek miażdżycowych [170]. W obecnej pracy korelacja stężenia LDL ze stężeniem 3-nitrotyrozyny była korelacja ujemną i dotyczyła chorych dializowanych otrzewnowo. Nie stwierdzono natomiast korelacji ze stężeniem HDL-cholesterolu. Może być to związane ze stopniem uszkodzenia składowych białkowych poszczególnych lipoprotein, zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym. Znaczna modyfikacja struktury lipoprotein nie tylko wpływa na zaburzenia gospodarki lipidowej w ustroju, ale także na wykrywanie LDL-C i HDL-C w testach laboratoryjnych.

Powiązanie pomiędzy wykładnikami nitracji a chorobami układu sercowo-naczyniowego poddano wnikliwej ocenie w pracy Shishehbor et al., którzy udowodnili, że podwyższone stężenie 3-nitrotyrozyny koreluje ze zwiększonym ryzykiem choroby wieńcowej, niezależnie od innych czynników ryzyka miażdżycy (wiek płeć, stężenie LDL-cholesterolu, HDL-cholesterolu, trójglicerydów oraz CRP, występowanie nadciśnienia tętniczego, cukrzycy i nikotynizmu) [223]. Gomez-Fernandez et al. oceniali morfologię ściany tętnicy promieniowej u chorych z PChN. W porównaniu do osób zdrowych stwierdzono nie tylko znaczące pogrubienie błony wewnętrznej i środkowej tętnicy, ale i zwiększoną kumulację 3-nitrotyrozyny oraz MCP-1 [224]. W pracy Kolagenovej et al. także wykazano zwiększone odkładanie 3-nitrotyrozyny w ścianie aorty u chorych z PChN. Zmiany te dotyczyły również naczyń bez cech kalcyfikacji, co potwierdza znaczenie stresu oksydacyjnego i azotowego w rozwoju powikłań naczyniowych w przebiegu PChN [225].

W obecnej pracy związek pomiędzy oksydacyjnymi modyfikacjami białek a parametrami gospodarki lipidowej dotyczył jednego z markerów, wykazujących powiązania zarówno z glikooksydacją, jak i ze stresem karbonylowym. Stężenie CEL u chorych hemodializowanych wykazywało umiarkowaną zależność ze stężeniem LDL-cholesterolu (zależność dodatnia) i stężeniem HDL-cholesterolu (zależność ujemna).

W hodowlach in vitro zaobserwowano, że AGEs wpływają istotnie na rozwój miażdżycy [226]. Modyfikacja lipoprotein drogą glikacji sprzyja rozwojowi zaburzeń lipidowych, gdyż utrudnia usuwanie LDL z krążenia i ułatwia utlenienie do ox-LDL [227]. Ponadto AGEs inaktywują PON-1, kluczowy enzym antyoksydacyjny obecny w HDL, który odpowiada ona za hamowanie peroksydacji lipidów oraz usuwanie cholesterolu z

monocytów/makrofagów [214]. W efekcie w warunkach nasilonego stresu oksydacyjnego rozwija się dyslipidemia typowa dla PChN. W pracach Kocaka et al. u chorych dializowanych otrzewnowo stężenia AGEs korelowały ze wskaźnikiem CCA-IMT [132].

Trzeba równocześnie zauważyć, że związek pomiędzy badanymi wykładnikami modyfikacji białek a gospodarką lipidową może też być konsekwencją powiązań szlaków metabolicznych dla poszczególnych związków. W warunkach nasilonej produkcji RFT lipooksydacja występuje równoległe do glikooksydacji. U pacjentów nefrologicznych stwierdza się korelację produktów peroksydacji lipidów, takich jak dialdehyd malonowolizyna, z CML zaliczaną do AGEs [63]. Wiadomo również, że CML może powstawać w wyniku utlenienia wolnych kwasów tłuszczowych. Jednak w badaniach Weiss et al., oceniających formowanie AGEs w dializacie na drodze lipooksydacji, nie wykazano, aby wolne kwasy tłuszczowe stanowiły znaczące źródło CML [135]. Odmienności szlaków metabolicznych mogą stanowić przyczynę różnic w charakterze korelacji związków powiązanych z glikooksydacją i lipooksydacją w porównaniu do pozostałych wykładników oksydacyjnych modyfikacji białek.

Trzeba też zwrócić uwagę, że w obecne prace stężenia markerów związanych ze stresem karbonylowym (MG, CEL, CML, AGEs, grupy karbonylowe białek) nie korelowały z laboratoryjnymi wykładnikami niedożywienia, w odróżnieniu od pozostałych wykładników modyfikacji białek. Jednym wyjątkiem jest umiarkowana ujemna zależność pomiędzy stężeniem CEL a stężeniem białka całkowitego i albuminy. Jednak dotyczyła ona wyłącznie grupy chorych z PChN w stadium G3b-G4, która nie wykazywała istotnych statystycznie różnic pod względem stężenia CEL na tle pozostałych grup oraz w porównaniu do osób zdrowych. Zaobserwowane odmienności dotyczące korelacji MG, CEL, CML, AGEs i grup karbonylowych białek – w porównaniu do pozostałych wykładników modyfikacji białek – mogą wynikać nie tylko z odrębnych dróg powstawania i dystrybucji w ustroju, ale również z powiązania ze stresem karbonylowym jako procesem odrębnym od stresu oksydacyjnego.

Wpływ stężenia sRAGE na gospodarkę lipidową i rozwój miażdżycy stanowi bardzo złożony problem. Wykazano, że u chorych z chorobą wieńcową stężenie sRAGE utrzymuje się na niższym poziomie, niż u osób zdrowych [228-229]. Z kolei cukrzyca oraz PChN powiązane są z wyższymi stężeniami sRAGE. Zasadnicze kwestia dotyczy zagadnienia, w jaki sposób uszkodzenie nerek wpływa na syntezę sRAGE. Czy jest to efekt spadku funkcji wydalniczej nerek, czy efekt wzmożonej syntezy sRAGE w odpowiedzi na kumulację ligandów (AOPPs, AGEs, białka S100A12 (EN-RAGE)? Czy w wyniku kumulacji ligandów RAGE dochodzi do wzmożonego pobudzenia RAGE na powierzchni komórek, wzmożonej

ekspresji genu RAGE i powstawania cRAGE z transbłonowego RAGE przy udziale metaloproteinaz? Czy może raczej dominuje droga alternatywnego splicingu transkryptu genu RAGE i synteza esRAGE jako czynnika chroniącego przed nadmiarem ligandów RAGE? Na modelach zwierzęcych udowodniono, że RAGE bierze udział w procesie powstawania neointymy, który prowadzi do restenozy naczyń tętniczych. Wyniki wskazują na zwiększoną obecność w ścianie naczynia zarówno RAGE, jak i AGEs oraz białek zaliczanych do grupy S100/kalgranulin. Kluczową rolę w tym powikłaniu miażdżycowym odgrywają komórki mięśni gładkich naczyń (ang. *vascular smooth muscle cells*, VSMC). Blokada interakcji RAGE z ligandami – przez sRAGE lub przeciwciała anti-RAGE – hamuje proliferację i migrację VSMC oraz syntezę białek macierzy pozakomórkowej [230-231]. In vitro, na hodowlach komórek śródbłonna ludzkiej aorty, także wykazano wpływ interakcji RAGE z ligandami (amfoteryna, białka z grupy S100/kalgranulin) na dysfunkcję śródbłonna, rozwój stanu zapalnego i tworzenie blaszki miażdżycowej [232]. Badania na myszach apoE(-), standardowym modelu zwierzęcym miażdżycy, dowiodły, że PChN nasila rozwój zmian miażdżycowych, a podanie przeciwciał anti-RAGE częściowo znosi ten efekt [232]. Opisano również ochronny wpływ podaży rekombinowanego sRAGE na neurony w przebiegu udaru niedokrwienego mózgu, zarówno na modelach zwierzęcych, jak i u badanych pacjentów [233].

W obecnej pracy grupa chorych z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie nie odróżniała się pod względem stężenia sRAGE w sposób statystycznie istotny od grupy zdrowych. Obserwacje te potwierdza praca Wanga et al., w której zaobserwowano, że stężenie sRAGE było istotnie wyższe tylko u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym, podczas gdy chorzy z przewlekłą chorobą niedokrwinną serca, poddawani planowej koronarografii, nie wykazywali istotnych różnic w stężeniu sRAGE w porównaniu do zdrowych [234].

Stężenie sRAGE w obecnych badaniach nie wykazywało zależności z typowymi zaburzeniami gospodarki lipidowej. Zaobserwowano jedynie ujemną korelację ze stężeniem cholesterolu całkowitego, co wpisywało się w całościowy obraz zależności stężenia sRAGE od laboratoryjnych wykładników niedożywienia. Potwierdza to znaczenie sRAGE jako parametru związanego z powikłaniami sercowo-naczyniowymi raczej poprzez nieklasyczne czynniki ryzyka, do których zalicza się stres oksydacyjny, zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej i gospodarki żelazowej oraz niedożywienie. Obecność PChN wpływa na stężenie sRAGE, a potencjalnie może też oddziaływać na związek pomiędzy sRAGE a postępem miażdżycy. Basta et al. opisali odwrotnie proporcjonalną korelację pomiędzy

stężeniem sRAGE a CCA-IMT [157]. Powiązanie to dotyczyło wyłącznie pacjentów z PChN, a nie występowało u osób z prawidłowym eGFR. Ponadto korelacja pomiędzy stężeniem sRAGE a wskaźnikiem CCA-IMT była niezależna od występowania innych czynników ryzyka miażdżycy, takich jak nikotynizm, cukrzyca, podwyższone ciśnienie skurczowe krwi, hipercholesterolemia i hipertriglicerydemia. W studium Kim JK et al. stężenie sRAGE korelowało odwrotnie proporcjonalnie z nasileniem zmian miażdżycowych, które oceniane było poprzez wskaźnik CCA-IMT oraz wskaźnik kalcyfikacji aorty brzusznej w tomografii komputerowej [158]. Korelacja ta również była niezależna od klasycznych czynników ryzyka miażdżycy. Z kolei Kim HS. et al. opisali negatywną korelację pomiędzy stężeniem sRAGE a wskaźnikiem kalcyfikacji naczyń krwionośnych ocenianym na podstawie zdjęć rentgenowskich odcinka lędźwiowego kręgosłupa [235]. Badania Kima JK et al. dotyczyły pacjentów dializowanych otrzewnowo, a Kima HS. et al. – chorych w programie hemodializ. Jednak pomimo związku pomiędzy stężeniem sRAGE a występowaniem zmian naczyniowych znaczna część prac neguje wpływ stężenia sRAGE na śmiertelność sercowo-naczyniową w przebiegu PChN [159, 161, 203-204].

#### **5.2.4. OCENIANE MODYFIKACJE BIAŁEK A ZABURZENIA GOSPODARKI WAPNIOWO-FOSFORANOWEJ**

W obecnej pracy zaobserwowano wzrost średniego stężenia PTH, poczynając od grupy pacjentów w stadium G3b-G4 PChN, poprzez grupę leczonych dializą otrzewnową, aż po grupę hemodializowanych, w której średnie stężenie PTH było najwyższe. Zależność od stężenia PTH dotyczyła dwóch związków – AOPPs oraz 3-nitrotyrozyny, w grupie hemodializowanych, którzy cechowali się najwyższym średnim stężeniem obu wykładników modyfikacji białek. Co więcej, w przypadku obu związków grupa hemodializowanych odróżniała się w sposób statystycznie istotny od wszystkich pozostałych grup. Sugeruje to znaczną rolę stresu oksydacyjnego jako następstwa wtórnej nadczynności przytarczyc u pacjentów leczonych w programie hemodializ.

PTH jest 84-aminokwasowym polipeptydem wydzielanym w odpowiedzi na hipokalcemię za pośrednictwem receptorów wrażliwych na wapń (ang. *calcium-sensing receptor*, CaSR) obecnych na powierzchni paratyreoocytów. W prawidłowych warunkach kalcytriol hamuje ekspresję genu PTH i zwiększa ekspresję genu CaSR [236]. W PChN, gdy dochodzi do niedoboru kalcytriolu, a także zmniejszenia liczby receptorów VDR, wydzielanie PTH rośnie. W efekcie rozwija się drugorzędowa nadczynność przytarczyc, w której wysokie

stężenia PTH, wywołane przewlekłą hipokalcemią i niedoborem kalcytriolu, towarzyszą hiperfosfatemii. Nadczynność przytarczyc, w połączeniu z niedoborem kalcytriolu, wpływa negatywnie na układ kostny. Dochodzi do zaburzeń metabolizmu kostnego i rozwija się osteodystrofia nerkowa oraz kalcyfikacja tkanek miękkich, w tym najbardziej typowe dla PChN zwapnienie błony śródkowej tętnic [237].

W większości dotychczas opublikowanych prac nie udowodniono, aby stężenie PTH bezpośrednio korelowało ze wzrostem stężenia wykładników oksydacyjnych modyfikacji białek [238-239]. Wyjątek stanowią badania Nakatani et al., gdzie zaobserwowano korelację pomiędzy stężeniem PTH a stężeniem utlenionej postaci albuminy (HNA), w której grupa tiolowa Cys-34 utworzyła wiązanie disiarczkowe [240]. Z drugiej strony, w badaniach in vitro stwierdzono, że PTH prowadzi do zaburzenia funkcji komórek śródbłonka w wyniku wzmożonej mitochondrialnej produkcji RFT. Efekt ten jest niezależny od witaminy D, przy czym stopień nasilenia produkcji RFT nie jest tak wysoki jak w stresie oksydacyjnym indukowanym hipoksją. Można wnioskować, że pod wpływem PTH nie dochodzi do bezpośredniego uszkodzenia komórki i apoptozy w wyniku wycieku RFT z mitochondriów, a raczej do zakłócenia szlaków sygnałowych na skutek oksydacyjnej modyfikacji białek. Zaburzenie wewnątrzkomórkowej homeostazy może prowadzić do nieprawidłowego funkcjonowania komórki, zakłócenia odpowiedzi komórkowej na szereg sygnałów oraz przesunięcia równowagi redox w stronę utleniania. Receptor PTH (PTH1R) po połączeniu z ligandem (PTH) doprowadza – poprzez szlak kinazy białkowej A (ang. *protein kinase A*, PKA) i kinazy białkowej C (ang. *protein kinase C*, PKC) – do wzmożonego uwalniania jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego do cytozolu. W kolejnym etapie obserwuje się zwiększenie napływu jonów wapnia przez mitochondrialny uniporter wapniowy i wyciek RFT z mitochondrium. Ostatecznie dochodzi do modyfikacji receptora bradykininy i zaburzenia odpowiedzi komórek śródbłonka na bradykininę. W podobnym mechanizmie następuje hamowanie angiogenezy w wyniku oksydacyjnych modyfikacji receptora dla czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) [241].

W badaniach Lin et al. udowodniono istotne statystycznie powiązanie pomiędzy AOPPs a wskaźnikiem kalcyfikacji tętnic wieńcowych i aorty brzusznej, ocenianym w tomografii komputerowej. Korelacja ta pojawiała się niezależnie od występowania innych chorób takich jak cukrzyca czy nadciśnienie tętnicze [242]. Z kolei Guilgen et al. udowodnili, że 3-nitrotyrozyna odkłada się w znaczących ilościach w naczyniach ze zwapnieniami u chorych z PChN [243]. Podkreśla to udział modyfikacji białek, wynikających ze wzmożonej

produkcji RFT i RFA, w promowaniu zwapnienia naczyń u chorych z PChN. PTH może odgrywać kluczową rolę jako czynnik łączący zaburzenia równowagi redox z uszkodzeniem naczyń w SNN. Związek pomiędzy nadczynnością przytarczyc a stresem oksydacyjnym stanowi kolejne ogniwo procesu, w którym modyfikacja białek przez RFA i RFT doprowadza do uszkodzenia układu krążenia.

Szczególnej uwagi w obecnych badaniach wymaga zależność pomiędzy stężeniem PTH a stężeniem 3-nitrotyrozyn w grupie dializowanych otrzewnowo – w odróżnieniu od korelacji w grupie hemodializowanych jest to zależność ujemna. Kluczowym zagadnieniem staje się pytanie o powiązanie pomiędzy i modyfikacjami białek, zaburzeniami gospodarki wapniowo-fosforanowej i charakterystycznym dla PChN zwapnieniem błony środkowej tętnic. W klasycznym ujęciu hiperfosfatemia wpływa na komórki mięśni gładkich naczyń (ang. *vascular smooth muscle cells*, VSMC), gdy wzmożony napływ fosforanów do komórki przez błonowy kontrtransporter Na-Pi III typu Pit-1 powoduje transformację osteoblastyczną oraz syntezę białek stymulujących kalcyfikację [244]. Podwyższone stężenie fosforanów hamuje także różnicowanie makrofagów w komórki podobne do osteoklastów, które odpowiedzialne są za resorpcję osteoidu [244]. Z kolei wapń wpływa na VSMC za pośrednictwem receptorów CaSR błony komórkowej. Ekspozycja na wysokie stężenia wapnia hamuje syntezę inhibitorów kalcyfikacji takich jak fetuina A [245]. Udowodniono też, że transformację osteoblastyczną VSMC stymuluje formowanie nanokryształów fosforanu wapnia, które dodatkowo zwiększają ekspresję białka BMP-2 promującego kalcyfikację [246]. Ważną rolę gra również deregulacja czynników kontrolujących gospodarkę wapniowo-fosforanową: kalcytriolu, PTH i białka Klotho. Nadmiar PTH w przebiegu nadczynności przytarczyc powoduje przyspieszenie obrotu kostnego z uwalnianiem do osocza dużej ilości wapnia i fosforanów. Z kolei białko Klotho działa hamująco na kontrtransporter Na-Pi III typu Pit-1, co zapobiega transformacji osteoblastycznej VSMC [245].

Jednak klasyczne ujęciu problemu zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej u chorych nefrologicznych nie tłumaczy szczególnej manifestacji klinicznej, jaką jest zwapniająca arteriopatía mocznicowa (kalcyfilaksja). W tym typie powikłań zwapnienia obejmują błonę środkową i wewnętrzną małych tętnic, czemu może towarzyszyć zwłóknienie błony wewnętrznej, zwapnienia pozanacyniowe oraz tworzenie skrzeplin. W efekcie u pacjenta obserwuje się mnogie zmiany zapalne i martwicze skóry. Patomechanizm zwapniającej arteriopatii mocznicowej nie został w pełni wyjaśniony. Rozbieżne dane dotyczące wpływu hipokalcemii, hiperfosfatemii i wysokich stężeń PTH wskazują, że zwapniająca arteriopatía mocznicowa w SNN nie jest prostą konsekwencją klasycznego

profilu zaburzeń wapniowo-fosforanowych. Sugeruje się, że adynamiczna choroba kości usposabia do rozwoju kalcyfilaksji, podobnie jak stosowanie doustnych antagonistów witaminy K oraz aktywnych postaci witaminy D [247-249]. Część badaczy stwierdza częstsze występowanie zwapniającej arteriopatii mocznicowej u chorych leczonych dializami otrzewnowymi, otyłych, z hipoalbuminemią oraz z zespołem metabolicznym. Stres oksydacyjny zaliczany jest do możliwych czynników promujących zwapnienie naczyń u chorych nefrologicznych. Udowodniono, że transformacji osteoblastycznej VSMC towarzyszy wzrost aktywności Nox oraz zmniejszenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych: SOD-1 i SOD-2 oraz Gpx1. Postuluje się również wpływ produktów działania RFT na VSMC i stymulowanie powstawania zwapnień błony środkowej [250-251]. Jednym z ogniw łączących oksydacyjne modyfikacje białek i zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej jest czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B. Receptor aktywujący NF- $\kappa$ B (ang. receptor *activator of nuclear factor NF- $\kappa$ B*, RANK) znajduje się na powierzchni licznych komórek (limfocyty, makrofagi, proteosteoklasty i osteoblasty, fibroblasty, chondrocyty, komórki śródbłonna naczyniowego). Połączeniu RANK z ligandem receptora aktywującego NF- $\kappa$ B (ang. *ligand of receptor activator of nuclear factor NF- $\kappa$ B*, RANKL) aktywuje proces dojrzewania osteoklastów. Z kolei osteoprotegeryna – jako białko błonowe występujące na powierzchni osteoblastów, limfocytów i megakariocytów oraz komórek śródbłonna – może kompetycyjnie wiązać RANKL, co zapobiega reakcji RANKL z RANK i pobudzeniu szlaku czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. Powstające w warunkach stresu oksydacyjnego RFT działają na oś RANKL/RANK/NF- $\kappa$ B – osteoprotegeryna [96]. Fizjologiczna równowaga pomiędzy czynnikami hamującymi kalcyfikację (fetuina A, osteopontyna, osteoprotegeryna) a czynnikami stymulującymi powstawanie zwapnień (osteokalcyna, fosfataza zasadowa) ulega wówczas zakłóceniu [252]. RFT mogą też nasilać apoptozę VSMC, a powstałe w wyniku tego ciała stają się ośrodkami krystalizacji, zapoczątkowującymi tworzenie kryształów fosforanu wapnia [250-251]. Znaczący udział wpływu stresu oksydacyjnego na rozwój zwapniającej arteriopatii mocznicowej potwierdzają pozytywne efekty leczenia tiosiarczanem sodu. Po podaniu dożylnym tiosiarczan sodu wiąże jony wapnia, tworząc łatwo rozpuszczalny tiosiarczan wapnia, który może zostać usunięty z organizmu przez nerki lub w czasie dializy [253]. Jednak efekt terapeutyczny wynika nie tylko ze zmniejszenia dostępności jonów wapnia, ale także z właściwości antyoksydacyjnych tiosiarczanu sodu, który posiada dwa niesparowane elektrony, dzięki czemu reaguje z RFT. Udowodniono też, że tiosiarczan sodu umożliwia



odtworzenie zapasów glutationu [252]. Wskazuje to na związek zwapniającej arteriolopatii mocznicowej ze stresem oksydacyjnym.

W obecnej pracy tylko w grupie dializowanych otrzewnowo stężenie PTH wykazywało ujemną zależność od stężenia 3-nitrotyrozyny. Chorzy leczeni dializą otrzewnową charakteryzują się niższymi stężeniami PTH oraz częstszym występowaniem choroby adynamicznej kości. W obecnej pracy średnie stężenie PTH było znacząco niższe w grupie dializowanych otrzewnowo, niż w grupie hemodializowanych. Równocześnie w grupie dializowanych otrzewnowo obserwowano mniej nasilone laboratoryjne wykładniki zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej: średnie stężenie fosforanów utrzymywało się w granicach wartości referencyjnych, średnie stężenia wapnia całkowitego i zjonizowanego nie zbliżały się do dolnych granic wartości referencyjnych. Być może stwierdzona korelacja obrazuje związek pomiędzy oksydacyjnymi modyfikacjami białek, adynamiczną chorobą kości a zwapnieniami naczyń typowymi dla PChN i niezależnymi do klasycznych czynników ryzyka. Udowodniono, że 3-nitrotyrozyna odkłada się w znaczących ilościach w naczyniach ze zwapnieniami u chorych z PChN, przy czym efekt ten zaobserwowano zarówno w porównaniu z próbkami od zdrowych dawców nerek oraz w porównaniu z próbkami od chorych w SNN, bez zwapnień w naczyniach [243]. Wpływ stosowania antagonistów witaminy K na rozwój zwapniającej arteriolopatii mocznicowej wynika z hamowania karboksylacji i fosforylacji białka Gla, znajdującego się w matrix ściany naczyń i wiążącego jony wapnia, co hamuje powstawanie zwapnień [247]. Być może ujemna korelacja stężenia 3-nitrotyrozyny z stężeniem PTH wynika z modyfikacji jednego z kluczowych białek wpływających na utrzymanie homeostazy wapniowo-fosforanowej w obrębie ściany naczyń. Trzeba jednak pamiętać, że wyniki dotychczasowych badań nie wskazują jednoznacznie na stres oksydacyjny jako decydujący czynnik odpowiadający za tworzenie zwapnień u chorych z PChN. W pracy Kolagenovej et al. wykazano zwiększone odkładanie 3-nitrotyrozyny w ścianie aorty u chorych z PChN, przy czym zmiany te dotyczyły także naczyń bez cech zwapnienia [225]. Ponadto lokalna kumulacja 3-nitrotyrozyny w zwapniałej ścianie naczyń nie musi przekładać się na korelację ze stężeniem 3-nitrotyrozyny w osoczu. Wiadomo, że inne wykładniki oksydacyjnych modyfikacji białek także związane są z tworzeniem zwapnień w układzie krążenia. Związek ten został przedstawiony w pracach Taki et al., w których opisano korelację pomiędzy stężeniem pentozydyny, stężeniem fosforanów, iloczynem wapniowo-fosforanowym i ciśnieniem skurczowym krwi a wskaźnikiem kalcyfikacji tętnic wieńcowych ocenianym w tomografii komputerowej [254]. Kitauchi et al. także zaobserwowali, że stężenie pentozydyny jest niezależnym czynnikiem kalcyfikacji aorty

brzuszej u pacjentów w programie hemodializ. W przypadku tej lokalizacji zwapnienia nie stwierdzono natomiast korelacji z parametrami gospodarki wapniowo-fosforanowej (stężenie wapnia, fosforu, PTH) ani z parametrami gospodarki lipidowej (stężenie całkowitego cholesterolu, LDL-cholesterolu, HDL-cholesterolu, trójglicerydów) [255]. Korelacja stężenia 3-nitrotyrozyny ze stężeniem PTH w obecnej pracy może też wynikać z stosowania u chorych leków wpływających na rozwój zwapniającej arteriolopatii mocznicowej (aktywne postaci witaminy D, antagoniści witaminy K). W szeregu prac opisano również problem wpływu polimorfizmu genu białka Gla na powstawanie zwapnień u chorych z PChN [256-257]. Niewielka liczebność badanej grupy w obecnej pracy może nasilać ten efekt. Z pewnością związek oksydacyjnych modyfikacji białek, zaburzeń wapniowo-fosforanowych i powstawania zwapnień w układzie krążenia wymaga dalszych, kompleksowych badań.

Białko Klotho występuje w postaci transbłonowej w komórkach nabłonka kanalików nerkowych i cewek zbiorczych, gdzie cechuje się wysoką ekspresją w porównaniu do innych tkanek takich jak mięśnie szkieletowe, jelito grube, przytarczyce, trzustka, jądra i jajniki [258]. Forma sekrecyjna Klotho, znajdująca się w osoczu, moczu i płynie mózgowo-rdzeniowym, może powstawać w wyniku działania enzymów z rodziny ADAM na postać transbłonową lub też w wyniku alternatywnego splicingu [269]. Klotho pełni kluczową rolę w regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej: zwiększa retencję kanałów wapniowych TRPV 5 na powierzchni komórek kanalików nerkowych, co umożliwia zwiększoną reabsorpcję zwrotną wapnia w nefronie [270]. Postać transbłonowa Klotho pełni też funkcję koreceptora dla FGF23 [271]. Wpływ Klotho na stres oksydacyjny związany jest ze szlakiem insuliny/IGF-1. Połączenie receptora insuliny/IGF-1 z ligandem skutkuje – kolejno – aktywacją 3-kinazy fosfatydyloinozytoli (PI3K), fosforylacją fosfatydyloinozytoli-4,5-bisfosforanu (PIP2) do fosfatydyloinozytoli-3,4,5-trisfosforanu (PIP3), aktywacją kinaz serynowo-treoninowych, w tym kinazy białkowej 1 zależnej od fosfatydyloinozytoli (PDK1), fosforylacją i aktywacją kinazy białkowej B (Akt/PKB). Aktywna kinaza białkowa B (Akt/PKB) odpowiada za fosforylację licznych białek w różnych kompartmentach komórki. Jednym z nich jest czynnik transkrypcyjny FOXO, który po fosforylacji traci swoją funkcję i pozostaje w cytoplazmie, zamiast ulec przesunięciu do jądra komórkowego. W obecności Klotho następuje zahamowanie aktywności szlaku insuliny/IGF-1, nie dochodzi do fosforylacji czynnika FOXO, który zostaje przetransportowany do jądra. W efekcie obserwuje się ekspresję genu mitochondrialnej SOD-2 [268,272].

W obecnym badaniu zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem białka Klotho w surowicy a stężeniem AOPPs i stężeniem 3-nitrotyrozyny, w grupie pacjentów

hemodializowanych. Część badań wykazała, że spadek stężenia Klotho w surowicy koreluje ze spadkiem wydolności nerek ocenianym wartością eGFR, podczas gdy w innych pracach nie wykazano pomiędzy nimi związku [274-275]. Podobne kontrowersje dotyczą powiązania pomiędzy stężeniem Klotho a stężeniem PTH i FGF23 [274]. Część badaczy postuluje kluczową rolę stężenia Klotho w moczu, a nie w surowicy, jako parametru prognostycznego u chorych nefrologicznych [273]. Trudności w ocenie wpływu Klotho na patogenezę PChN wynikają zarówno z jego wielokierunkowego działania, jak i z zastrzeżeń dotyczących różnic w działaniu postaci transbłonowej i postaci sekrecyjnej. Jednak szereg prac wykazał związek Klotho ze stresem oksydacyjnym i oksydacyjnymi modyfikacjami w wyniku wzmożonej produkcji RFT. Yamamoto et al. udowodnili na modelach zwierzęcych, że wzrost 8-hydrokso-2-deoksyguanozyny (ang. *8-hydroxy-2-deoxyguanosine*, 8-OH-dG), kluczowego wykładnika oksydacyjnego uszkodzenia DNA [276]. Z kolei *in vitro* białko Klotho hamowało peroksydację lipidów, zachodzącą pod wpływem parakwatu, który odpowiedzialny jest za produkcję  $O_2^{\cdot -}$  [276]. W badaniach Raesi et al. stwierdzono, że u szczurów otrzymujących cyklosporynę stężenie Klotho w surowicy korelowało odwrotnie proporcjonalnie z stężeniem 8-OH-dG i MDA [277]. Praca Oh et al., która objęła 78 chorych dializowanych otrzewnowo, opisała odwrotnie proporcjonalną zależność pomiędzy stężeniem białka Klotho w surowicy a stężeniem 8-izoprostanoidów [278].

Potencjalne ogniwo łączące Klotho z AOPPs może stanowić szlak Wnt/ $\beta$ -katenina, w którym połączenie liganda Wnt z receptorem Fzd i koreceptorami LRP 5 i 6 prowadzi do fosforylacji białka cytozolowego Dvl. Ufosforylowane białko Dvl transportowane jest do błony komórkowej, gdzie aktywuje  $\beta$ -kateninę.  $\beta$ -katenina ulega translokacji do jądra komórkowego i łączy się z kompleksem czynników transkrypcyjnych TCF/LEF, powodując ich aktywację. Działanie szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina jest istotnym elementem uszkodzenia podocytów w kłębuszkach nerkowych. Prowadzi do nasilonej ekspresji genu białka Snail1, które jest represorem transkrypcji genu nefryny, kluczowego białka formującego szkielet błon szczelinowych podocytów. Ponadto białko Snail1 bierze udział w transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej, której ulegają podocyty w przebiegu PChN. Aktywacja szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina wiąże się także ze wzmożoną syntezą białek macierzy pozakomórkowej oraz proteinaz uszkadzających podocyty, co prowadzi do włóknienia kłębuszków nerkowych. Udowodniono, że Klotho powoduje supresję szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina poprzez hamowanie połączenia liganda z receptorem [273]. Z drugiej strony, AOPPs aktywują szlak Wnt/ $\beta$ -katenina poprzez aktywację receptora RAGE i szlak czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B [280]. Zhou et al. udowodnili, że u chorych z pierwotnymi kłębuszkowymi zapaleniami nerek blokada szlaku

Wnt/ $\beta$ -katenina przez Klotho chroniła podocyty przed toksycznym działaniem AOPPs [280]. W obecnej pracy średnie stężenie AOPPs najwyższe wartości osiągało w grupie hemodializowanych, która odróżniała się w sposób statystycznie istotny od wszystkich pozostałych grup. Świadczy to o znacznym nasileniu modyfikacji białek, którego następstwem jest maksymalna kumulacja AOPPs. U tych pacjentów może dochodzić do próby kompensacji uszkadzającego działania RFT i produktów ich działaniach na organizm – takich jak AOPPs – poprzez wzmożoną syntezę Klotho. Jednak znaczny stopień zaawansowania choroby uniemożliwia prawidłową obronę ustroju, co tłumaczy niskie stężenia Klotho w tej grupie badanych. Podobną zależność obserwowano w obecnej pracy u pacjentów hemodializowanych w stosunku do stresu azotowego, którego wykładnikiem jest 3-nitrotyrozyna, oraz stężenia białka Klotho; zwłaszcza że kumulacja 3-nitrotyrozyny również najsilniej była zaakcentowana w grupie hemodializowanych. Potwierdza to badanie Kimury et al., w którym myszy pozbawione Klotho cechowały się wzmożonym odkładaniem 3-nitrotyrozyny w nerkach [281].

Dodatnia zależność w stosunku do stężenia białka Klotho dotyczyła również kolejnego związku, który bierze udział w modyfikacji białek w wyniku stresu oksydacyjnego i karbonylowego - MG, ale odnosiła się do grupy dializowanych otrzewnowo. Podobnie, jak w przypadku zależności stężenia AOPPs i stężenia 3-nitrotyrozyny, również w przypadku stężenia MG zależność dotyczyła grupy o najwyższym stężeniu związku. Grupa ta odróżniała się też w sposób statystycznie istotny na tle pozostałych grup. W pracy Zhao et al. w hodowlach *in vitro* komórek nabłonka kanalików nerkowych myszy stwierdzono zmniejszenie ekspresji genu Klotho (ocenianej zarówno przez ocenę mRNA, jak i samego białka) pod wpływem MG połączonego z albuminą. Z drugiej strony, podanie sekrecyjnego Klotho do hodowli powodowało supresję szlaku czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B i obniżone wydzielanie cytokin prozapalnych w odpowiedzi na stymulację TNF- $\alpha$ . Zahamowanie szlaku NF- $\kappa$ B nie odbywało się przez hamowanie fosforylacji i degradacji białek inhibitorowych (I $\kappa$ B) lub hamowanie transportu czynnika transkrypcyjnego (białka RelA i p50) do jądra. Kluczowy mechanizm stanowiła inhibicja zależnej od TNF- $\alpha$  fosforylacji białka RelA i rekrutacji czynnika transkrypcyjnego dla promotorów genów IL-8 i MCP [282]. MG powiązany jest zarówno ze stresem oksydacyjnym, jak i ze stresem karbonylowym. Pod wieloma względami zachowuje się w sposób odmienny AOPPs i 3-nitrotyrozyny, co wynika z wielkości cząsteczki, jej reaktywności i możliwości przenikania przez błony komórkowe oraz dróg powstawania i usuwania z ustroju. Jednak w końcowym etapie kluczową rolę ponownie wydaje się odgrywać białko Klotho i jego potencjał antyoksydacyjny. U chorych ze znacznym

nasileniem stresu oksydacyjnego i karbonylowego może dochodzić do próby kompensacji uszkodzającego działania RFT i produktów ich działaniach na organizm poprzez wzmożoną syntezę Klotho. Znaczne zaawansowanie PChN i rozwój jej powikłań – w tym przewlekłego stanu zapalnego i zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej – utrudnia prawidłową obronę przez RFT, co tłumaczy niskie stężenia Klotho u chorych w SNN, mimo narastającego stężenia MG.

W obecnej pracy stwierdzono również ujemną zależność pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem wapnia całkowitego i zjonizowanego w grupie hemodializowanych. Zależności te nie pojawiały się w grupie zdrowych ani w grupie chorych z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie, mimo niższego średniego stężenia wapnia w tych grupach. Nie można więc stwierdzić, że stężenie sRAGE zależało bezpośrednio od stężenia wapnia w osoczu. Być może związek ten wynika z całościowego wpływu zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej, który doprowadza do spadku stężenia wapnia we krwi w SNN. Sung et al. udowodnili, że podaż kalcytriolu u chorych hemodializowanych z wtórną nadczynnością przytarczyc podwyższa stężenie sRAGE [283]. Z kolei w pracy Galicheta et al. wykazano, że wapń reguluje wewnątrzłonową obróbkę RAGE do cRAGE przez metaloproteinazę ADAM10 i  $\gamma$ -sekretazę [284], choć trzeba zaznaczyć, że badanie to dotyczyło kompartmentu wewnątrzkomórkowego, gdzie stężenie wapnia nie jest prostą pochodną stężenia w osoczu.

### **5.2.5. OCENIANE MODYFIKACJE BIAŁEK A ZABURZENIA GOSPODARKI ŻELAZOWEJ**

Gospodarka żelazem i jej zaburzenia są ściśle powiązane ze stresem oksydacyjnym. Jony żelaza – jako jony metalu przejściowego – ułatwiają utlenienie szeregu związków, co prowadzi do modyfikacji aminokwasów, białek, lipidów i kwasów nukleinowych. W warunkach fizjologicznych większość jonów żelaza jest związana z białkami, co uniemożliwia ich działanie jako katalizatorów reakcji utleniania. PChN zaburza homeostazę wewnątrzustrojową, co skutkuje zwiększoną dostępnością jonów żelaza w osoczu.

W obecnej pracy stężenie CML oraz stężenie grup karbonylowych białek wykazywało dodatnią zależność ze stężeniem jonów żelaza w grupie hemodializowanych. Dodatkowo stężenie CML wykazywało ujemną zależność z wartością UIBC w grupie dializowanych otrzewnowo. Znaczna dywergencja szlaków metabolizmu AGEs może wpływać na powiązanie poszczególnych związków z parametrami gospodarki żelazowej. Glikooksydacja

szlakiem Wolffa polega na autooksydacji cukrów przy udziale jonów metali przejściowych, co prowadzi do powstawania związków dikarbonylowych, reagujących z grupami aminowymi białek. W obecnych badaniach szlak Wolffa może odpowiadać za ujemną korelację stężenia CML z wartością UIBC oraz za dodatnią korelację ze stężeniem żelaza. Wydaje się, że zwłaszcza CML, spośród wszystkich AGEs, powstaje na drodze utleniania z udziałem jonów metali przejściowych. Praca Weiss et al., która oceniała drogi powstawania AGEs, polegała na ocenie próbek osocza zdrowych ochotników, chorych hemodializowanych oraz dializatu z jamy otrzewnej. Próbkę te poddawano inkubacji z szeregiem substancji sprzyjających formowaniu AGEs (roztwór glukozy, dipeptyd Lys-Arg) oraz hamujących formowanie AGEs (CAT, chelatory jonów metali, aminoguanidyna). Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami pozwoliły postawić hipotezę, że prekursor CML powstaje w osoczu najprawdopodobniej podczas utleniania z udziałem jonów metali przejściowych, podczas gdy prekursor pentozydyny jest trwale obecny w osoczu pacjentów z SNN nerek. Dodatkowo prekursor pentozydyny wydaje się nie zaliczać do reaktywnych związków dikarbonylowych, w odróżnieniu do prekursora CML [135].

Zwiększona dostępność wolnych jonów żelaza wpływa również na nasilenie karbonylacji białek. Udowodniono, że utlenienie reszt lizynowych, argininowych i treoninowych prowadzi do pojawienia się grup karbonylowych, przy czym ten typ reakcji katalizowany jest przez jony metali przejściowych [74-75]. W pracach Mimić-Oka et al. oraz Anraku et al. stwierdzono, że dożylne podanie związków żelaza u chorych hemodializowanych powoduje wzrost stężenia grup karbonylowych białek oraz utlenionej albuminy [285-286]. W badaniach *in vitro* utlenianie osocza prowadziło do wprowadzenia dodatkowych grup karbonylowych głównie w obrębie fibrynogenu oraz, w mniejszym stopniu, albuminy, transferyny, immunoglobulin G i A [74].

W obecnej pracy nie stwierdzono korelacji stężenia 3-nitrotyrozyny z parametrami gospodarki żelazowej, pomimo że nitracja może zachodzić przy udziale jonów metali przejściowych. Być może w syntezie RFA w przebiegu PChN większe znaczenie mają enzymy z grupy peroksydaz oraz zaburzenia metabolizmu NO, niż zaburzenia gospodarki żelazem.

Trzeba zwrócić uwagę, że w obecnej pracy korelacje stężenia CML i grup karbonylowych białek bezpośrednio ze stężeniem żelaza dotyczyły jedynie grupy chorych hemodializowanych, która cechowała się wyższym średnim stężeniem żelaza niż pozostali pacjenci nefrologiczni, przy niskich wartościach TIBC i UIBC, przekraczających dolne granice wartości referencyjnych, oraz wysokich stężeniach ferrytyny, przekraczających górną

granicę wartości referencyjnych. W przebiegu PChN rozwijają się zaburzenia gospodarki żelazowej w postaci tzw. bloku zapalnego, charakteryzującego się niskim wysyceniem transferyny żelazem, wysokim stężeniem ferrytyny oraz opornością na suplementację żelaza. Te nieprawidłowości osiągają maksimum u pacjentów hemodializowanych, co znajduje odzwierciedlenie w parametrach laboratoryjnych. U podstaw bloku zapalnego leży deregulacja osi hepcydyna – ferroportyna. Ferroportyna jest białkiem błonowym, obecnym na enterocytach dwunastnicy, hepatocytach i makrofagach, odpowiedzialnym za transport żelaza z komórki do przestrzeni pozakomórkowej. Z kolei hepcydyna, produkowana w wątrobie i wydzielana do osocza, łączy się z ferroportyną, co powoduje internalizację i degradację kompleksu. Hepcydyna zmniejsza też ekspresję genu transferyny, kluczowego białka transportującego jony żelaza [287]. W przebiegu PChN stwierdza się podwyższone stężenia hepcydyny, co wynika ze spadku klirensu nerkowego oraz ze wzrostu syntezy w wątrobie [287]. W efekcie dochodzi do upośledzenia wchłaniania żelaza oraz uwięzienia żelaza w komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego. Udowodniono, że czynnikiem stymulującym ekspresję genu hepcydyny są cytokiny prozapalne, zwłaszcza IL-6 [288-289]. Dyskusyjny jest natomiast bezpośredni wpływ RFT na syntezę hepcydyny – nie udało się udowodnić związku między markerami stresu oksydacyjnego a stężeniem hepcydyny [290].

W obecnych badaniach jedynie chorzy hemodializowani otrzymywali suplementację żelaza w postaci iniekcji dożylnych. Dożylna suplementacja zapewnia odpowiednią dostępność jonów żelaza dla komórek linii erytropoetycznej w szpiku, ale równocześnie przyczynia się do nasilania stresu oksydacyjnego. Jony metali przejściowych takich jak żelazo, miedź, mangan czy nikiel, stanowią katalizator reakcji Fentona, w której z  $H_2O_2$  powstaje wysoce reaktywny  $HO^\bullet$ . W kolejnym etapie  $O_2^{\bullet-}$  redukuje utleniony jon metalu, dzięki czemu może on ponownie wchodzić w reakcję z  $H_2O_2$ . Zarówno reakcja Fentona, jak i reakcja regeneracji, przebiegają spontanicznie i z dużą szybkością, co umożliwia generowanie znacznych ilości  $HO^\bullet$ . Udowodniono, że dożylnie podanie związków żelaza u pacjentów z PChN powoduje znaczny wzrost stężenia utlenionych lipidów, białek i DNA [291]. Ponadto jony żelaza, jeśli nie zostaną związane przez transferynę lub ferrytynę, mogą ułatwić reakcje glikooksydacji szlakiem Wolffa oraz utlenianie białek z wprowadzeniem grup karbonylowych, zwłaszcza u chorych charakteryzujących się wysokim stężeniem żelaza we krwi, przy niskim wysyceniu transferyny [291].

Odmienny typ zależności, obejmujący parametry gospodarki żelazowej, dotyczył w obecnej pracy stężenia MG oraz stężenia grup karbonylowych białek. Stężenie MG wykazywało dodatnią zależność z wartością TIBC i UIBC oraz ujemną zależność ze

stężeniem ferrytyny – korelacje dotyczyły grupy hemodializowanych. Natomiast stężenie grup karbamylowych białek wykazywało zależność dodatnią z wartością UIBC w grupie dializowanych otrzewnowo.

Potencjalne powiązanie pomiędzy zależnościami dotyczącymi oksydacyjnych modyfikacji białek, związków dikarbonylowych oraz zaburzeń gospodarki żelazem u chorych w SNN może stanowić reakcja opisana w pracy An et al., w której oceniano wpływ inkubacji MG na ferrytynę. Zaobserwowano, że pod wpływem MG dochodziło do tworzenia agregatów ferrytyny, które wynikało z powstawania krzyżowych wiązań dityrozynowych, typowych dla modyfikacji prowadzących do syntezy AOPPs. Utlenianie ferrytyny najczęściej obejmowało reszty argininowe, histydynowe i lizynowe. Reakcja ulegała zahamowaniu w obecności antyoksydantów, co świadczyło o udziale RFT. Równocześnie działanie MG na ferrytynę skutkowało uwolnieniem jonów żelaza z połączenia z białkiem, co umożliwiało dalsze reakcje utleniania, zarówno na drodze glikooksydacji, jak i utleniania grup tiolowych [292].

Natomiast trudniej wytłumaczyć związek pomiędzy karbamyłacją a zaburzeniami gospodarki żelazem. W literaturze nie opisano, aby jony metali przejściowych wpływały na karbamyłację białek jako katalizator reakcji. Być może karbamyłacja nasila zaburzenia gospodarki żelazowej poprzez modyfikacje kluczowych białek takich jak haptoglobina, transferyna, heocydyna lub ferroportyna. Wymaga to jednak dalszych badań w celu określenia nasilenia karbamyłacji oraz jej potencjalnego wpływu na funkcje białek.

#### **5.2.6. POZOSTAŁE KORELACJE OCENIANYCH MODYFIKACJI BIAŁEK Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI**

W obecnej pracy stwierdzono zależność w grupie hemodializowanych pomiędzy stężeniem MG a stężeniem kreatyniny i wartości eGFR (w grupie hemodializowanych). Podobnych zależności nie stwierdzono dla związków z grupy AGEs. Co więcej, w przypadku stężenia MG zaobserwowano, że grupa z PChN w stadium G3b-G4 różniła się w sposób statystycznie istotny od grupy zdrowych, czego nie zaobserwowano w przypadku oceny stężenia CEL i AGEs. Sugeruje to znaczny wpływ wydolności nerek na kumulację związków dikarbonylowych. Zależność ta wydaje się silniejsza, niż w przypadku CEL, CML i AGEs, co może wynikać z ich odmiennej reaktywności, dróg powstawania i metabolizmu w ustroju. Powiązanie pomiędzy stężeniem MG a zaawansowaniem PChN potwierdza praca Antoliniego et al., w której zaobserwowano, że u pacjentów, u których po przeszczepie stężenie kreatyniny mieści się w granicach wartości referencyjnych, stężenie związków



dikarbonylowych ulega normalizacji i nie różni się od stężenia w osoczu zdrowych ochotników. Natomiast stężenia AGEs związanych z białkami również korelowało ze spadkiem stężenia kreatyniny, ale nie ulegało całkowitej normalizacji w porównaniu do stężeń u osób zdrowych [293]. Podobne obserwacje dotyczyły także dzieci po przeszczepie nerki [136]. Z kolei w badaniach Ito et al. zaobserwowano, że w grupie chorych z cukrzycową chorobą nerek stężenie N $\delta$ -(5-hydro-5-metylo-4-imidazolono-2-yl)-ornityny (MG-H1) koreluje ze spadkiem GFR, a nie ze stężeniem glikowanej hemoglobiny. MG-H1 jest związkiem zaliczanym do AGEs, który powstaje w wyniku reakcji MG z resztami argininy. Jednocześnie nie stwierdzono, aby podobny związek z funkcją nerek dotyczył stężenia CML, która powstaje raczej w wyniku reakcji gliksalu, niż MG, z grupami aminowymi cukrów [294].

Gromadzenie się AGEs w PChN jest niezależne od stężenia glukozy. W odróżnieniu od chorych z cukrzycą, u osób hemodializowanych nie stwierdza się korelacji stężenia CML i pentozydyny ze stężeniami fruktozylizyny, produktu reakcji Amadori, który powstaje w warunkach hiperglikemii [63,135]. Jednak w obecnej pracy stężenie MG wykazywało korelację ze stężeniem glukozy. Trzeba jednak zwrócić uwagę, że dotyczyło to jedynie chorych dializowanych otrzewnowo, u których stosowanie płynów glukozowych może skutkować powtarzającymi się epizodami hiperglikemii. Sprzyja to nieenzymatycznej glikacji i tworzeniu MG w ustroju. Ponadto sterylizacja płynów dializacyjnych w wysokiej temperaturze prowadzi do syntezy GDPs, które inicjują reakcje grup karbonylowych cukrów z grupami aminowymi reszt aminokwasowych białek, kwasów nukleinowych i fosfolipidów. Powstałe w ten sposób związki mogą ulec resorpcji z jamy otrzewnej do układu krążenia i układu limfatycznego [140]. MG jako związek dikarbonylowy cechuje się mniejszą masą cząsteczkową, niż AGEs, co ułatwia jego absorpcję z płynu dializacyjnego przez pory otrzewnej do krwi.

W obecnej pracy zaobserwowano ujemną korelację stężenia kwasu moczowego ze stężeniem AGEs w grupie hemodializowanych. Kwas moczowy jest końcowym produktem metabolizmu zasad purynowych, wydalany w kanalikach nerkowych. Szereg badań sugeruje, że kumulacja kwasu moczowego wpływa na bezpośrednio na postęp PChN i jej powikłania. W warunkach hiperurykemii dochodzi do wytrącania kryształów moczanowych, które uszkadzają kłębuszki, ale dowiedziono, że istnieje także odmienny mechanizm, związany ze wzrostem ciśnienia wewnątrz kłębuszków i ich przerostem. Na modelach zwierzęcych udowodniono, że wzrost stężenia kwasu moczowego – poprzez wpływ na kłębuszki nerkowe – powoduje wzrost ciśnienia systemowego krwi [295]. Jednak należy

zauważyć, że w zaawansowanych stadiach PChN podstawowym mechanizmem wzrostu ciśnienia systemowego jest retencja sodu i wody. W pracy Mader et al. u chorych z niewydolnością nerek stężenie kwasu moczowego nie stanowiło czynnika ryzyka postępu PChN, a z drugiej strony – hiperurykemia korelowała ze śmiertelnością z przyczyn sercowo-naczyniowych [296].

W obecnej pracy stwierdzono ujemną zależność pomiędzy stężeniem kwasu moczowego a stężeniem AGEs (w grupie hemodializowanych). Należy zauważyć, że tej grupie średnie stężenie kwasu moczowego utrzymywało się w granicach wartości referencyjnych, podczas gdy w literaturze negatywne skutki działania kwasu moczowego opisywane były głównie w warunkach hiperurykemii, gdy dochodziło do wzmożonego przenikania kwasu moczowego przez błonę komórkową. Wiele prac potwierdziło też związek kwasu moczowego z nasileniem produkcji RFT i utlenianiem związków wielkocząsteczkowych [297]. Kwas moczowy jest jednym z najbardziej selektywnych antyoksydantów, odpowiadającym za 60% całkowitej zdolności antyoksydacyjnej osocza. W fizjologicznych stężeniach odpowiada on za wiązanie HO<sup>•</sup> i jonów metali przejściowych [298]. Kwas moczowy chroni także osoczną SOD-3 przed atakiem RFT [299]. Z drugiej strony, udowodniono, że wzmożony napływ kwasu moczowego do komórki prowadzi od oksydacyjnego uszkodzenia poprzez utlenianie lipidów, hamowanie syntezy NO oraz stymulację szlaków prozapalnych związanych z czynnikiem jądrowym NF-κB, TGF-β oraz MCP-1 [297]. Na modelach zwierzęcych wykazano również, że w warunkach hiperurykemii dochodzi do uszkodzenia mitochondriów z wyciekami RFT [298].

Ujemna zależność pomiędzy stężeniem kwasu moczowego a wykładnikami oksydacyjnymi modyfikacji białek wskazuje na znaczącą rolę kwasu moczowego jako głównego antyoksydantu osocza. Dodatkowym ogniwem wiążącym stężenie kwasu moczowego ze zaburzeniami równowagi redox mogą stanowić jony metali przejściowych i ich rola w powstawaniu AGEs. Udowodniono, że kwas moczowy wiąże jony metali przejściowych, w tym jony żelaza [300], które, zgodnie z pracą Weiss et al., biorą udział w syntezie niektórych AGEs [135]. Tak więc wyższe stężenia kwasu moczowego mogą chronić przed reakcjami glikooksydacji i modyfikacji białek z tworzeniem AGEs, przy założeniu że w ustroju nie dojdzie do patologicznego gromadzenia kwasu moczowego i kumulacji wewnątrzkomórkowej.

Warto zauważyć, że szereg leków stosowanych u chorych z PChN wpływa na stężenie kwasu moczowego (inhibitory konwertazy angiotensynowej, losartan, inhibitory oksydazy ksantynowej). Leki te mogą wpłynąć na powiązania pomiędzy stężeniem kwasu moczowego

a innymi parametrami laboratoryjnymi i wykładnikami modyfikacji białek. Niewielka liczebność badanych grup może dodatkowo potęgować ten efekt.

### **5.3. GRUPY BADANYCH A ROZKŁAD OCENIANYCH WYKŁADNIKÓW MODYFIKACJI BIAŁEK I ICH KORELACJI Z PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI**

#### **5.3.1. GRUPA PRE**

1. Grupa chorych z PChN w stadium G3b-G4 nie odróżniała się w sposób statystycznie istotny od grupy zdrowych w przypadku oceny stężenia CEL, AGEs i sRAGE, ani od grupy chorych z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie w przypadku oceny stężenia AOPPs, CEL, AGEs, grup karbonylowych białek, sRAGE i grup karbamylowych białek. Jedynie w przypadku oceny stężenia MG i CML oraz 3-nitrotyrozyny grupa PRE odróżniała się w sposób statystycznie istotny od grupy zdrowych i grupy z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie, ale w przypadku żadnego z wykładników oksydacyjnych modyfikacji białek nie stwierdzono, aby grupa PRE różniła się w sposób statystycznie istotny na tle wszystkich pozostałych grup.
2. Grupa chorych z PChN w stadium G3b-G4 – w porównaniu do pozostałych grup nefrologicznych – cechowała się stosunkową niewielką liczbą zależności pomiędzy wykładnikami oksydacyjnych modyfikacji białek a parametrami laboratoryjnymi. Wyjątek stanowią markery: CEL, 3-nitrotyrozyna oraz grupy karbamyłowe białek, których zależności w grupie PRE dotyczyły głównie laboratoryjnych wykładników niedożywienia (stężenie białka całkowitego i albuminy, stężenie kreatyniny i mocznika).

#### **5.3.2. GRUPA DO**

1. Grupa DO odróżniała się w sposób statystycznie istotny od grupy zdrowych w przypadku wszystkich wykładników oksydacyjnych modyfikacji białek, za wyjątkiem CML. Grupa DO odróżniała się w sposób statystycznie istotny na tle wszystkich pozostałych grup w przypadku oceny stężenia AOPPs, MG i CEL. Maksymalne średnie stężenie MG i CEL oraz sRAGE również zanotowano w grupie DO.

2. Zależności pomiędzy wykładnikami oksydacyjnych modyfikacji białek a laboratoryjnymi wykładnikami niedożywienia i dyslipidemi dotyczyły głównie grupy DO. Korelacje te dotyczyły związków: AOPPs, AGEs, sRAGE, 3-nitrotyrozyny.
3. W przypadku żadnego z wykładników oksydacyjnych modyfikacji białek w grupie DO nie stwierdzono zależności ze stężeniem CRP. Zależność z wartością WBC pojawiały się, ale nie tworzyły spójnej tendencji.
4. Zależności pomiędzy wykładnikami oksydacyjnych modyfikacji białek a parametrami gospodarki wapniowo-fosforanowej dotyczyły tylko 3-nitrotyrozyny oraz MG. W przypadku oceny stężenia MG grupa DO charakteryzowała się najwyższym średnim stężeniem związku, a zależność dotyczyła powiązania ze stężeniem białka Klotho.
5. Parametry gospodarki żelazowej wykazywały zależność tylko ze stężeniem CML oraz ze stężeniem grup karbamylowych białek. Zależność każdorazowo dotyczyła wartości UIBC.

### **5.3.3. GRUPA HD**

1. Grupa HD odróżniała się w sposób statystycznie istotny od grupy zdrowych w przypadku wszystkich wykładników oksydacyjnych modyfikacji białek. Grupa HD odróżniała się w sposób statystycznie istotny na tle wszystkich pozostałych grup w przypadku oceny stężenia wszystkich wykładników oksydacyjnych modyfikacji białek, za wyjątkiem grup karbamylowych białek. Maksymalne średnie stężenie AOPPs, CML, AGEs, grup karbonylowych białek oraz 3-nitrotyrozyny również zanotowano w grupie HD.
2. W przypadku następujących wykładników oksydacyjnych modyfikacji białek: MG, CEL, CML, AGEs, grupy karbonylowe białek, grupy DO i HD różniły się od siebie w sposób statystycznie istotny.
3. Zależności pomiędzy wykładnikami oksydacyjnych modyfikacji białek a laboratoryjnymi wykładnikami niedożywienia oraz dyslipidemii w grupie HD były mniej liczne, niż w grupie DO. Dotyczyły one wyłącznie sRAGE oraz CEL.
4. W przypadku żadnego z wykładników oksydacyjnych modyfikacji białek w grupie HD nie stwierdzono zależności ze stężeniem CRP. Zależność z wartością WBC pojawiała się w grupie HD wyłącznie w odniesieniu do AGEs.
5. Zależności pomiędzy wykładnikami oksydacyjnych modyfikacji białek a parametrami gospodarki wapniowo-fosforanowej dotyczyły AOPPs oraz 3-nitrotyrozyny. W przypadku oceny stężenia AOPPs oraz 3-nitrotyrozyny grupa HD charakteryzowała

się najwyższym średnim stężeniem związków, a zależność dotyczyła powiązania ze stężeniem PTH i stężeniem białka Klotho.

6. Parametry gospodarki żelazowej wykazywały zależność ze stężeniem następujących wykładników oksydacyjnych modyfikacji białek: MG, CML, grupy karbonyłowe białek. Zależności dotyczyły stężenia żelaza, wartości TIBC i UIBC oraz stężenia ferrytyny.
7. W grupie HD stwierdzono zależność pomiędzy stężeniem AGEs a stężeniem kwasu moczowego.

## 6. WNIOSKI

1. Schyłkowa niewydolność nerek powoduje większe nasilenie modyfikacji białek, niż przewlekła choroba nerek we wcześniejszych stadiach.
2. Hemodializoterapia, jako metoda leczenia nerkozastępczego, cechuje się większym nasileniem modyfikacji białek, niż dializoterapia otrzewnowa.
3. Nasilenie modyfikacji białek u chorych dializowanych otrzewnowo powiązane jest z niedożywieniem i dyslipidemią, a u chorych hemodializowanych – z wtórną nadczynnością przytarczyc i zaburzeniami gospodarki żelazem.
4. Kumulacja modyfikacji białek u chorych w schyłkowej niewydolności nerek jest silniej wyrażona, niż u chorych z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie, co potwierdza hipotezę o kluczowym znaczeniu stresu oksydacyjnego jako nieklasycznego czynnika ryzyka sercowo-naczyniowego w przebiegu przewlekłej choroby nerek.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- [1] KDIGO CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kid. Int. Suppl.*, 2013; 3: 1–150
- [2] Rutkowski B. Przewlekła choroba nerek (PChN) – wyzwanie XXI wieku. *Przew. Lek.*, 2007; 2: 80-88
- [3] Muntner P, He J, Astor BC, Folsom AR, Coresh J. Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005; 16(2): 529-538.
- [4] Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2016; 25(3): 119-146.
- [5] Dębska-Slizień A, Rutkowski B, Rutkowski P, Korejwo G, Jagodziński P, Przygoda J, Lewandowska D, Czerwiński J, Kamiński A, Gellert R. Aktualny stan dializoterapii w Polsce - 2018. *Nefrol. Dial. Pol.*, 2019; 23: 113-122.
- [6] Zabłocka A, Janusz M. Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. *Postepy. Hig. Med. Dosw.*, 2008; 62: 118-124.
- [7] Poulianiti KP, Kaltsatou A, Mitrou GI, Jamurtas AZ, Koutedakis Y, Maridaki M, Stefanidis I, Sakkas GK, Karatzaferi C. Systemic Redox Imbalance in Chronic Kidney Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016; 8598253.
- [8] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.*, 2012; 5(1): 9-19.
- [9] Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch. Toxicol.*, 2016; 90(1): 1-37.
- [10] Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.*, 2003; 63(1): 179-185.
- [11] Morena M, Cristol JP, Senécal L, Leray-Moragues H, Krieter D, Canaud B. Oxidative stress in hemodialysis patients: is NADPH oxidase complex the culprit? *Kidney Int., Suppl.* 2002; 80: 109-14.
- [12] Fortuño A, Beloqui O, San José G, Moreno MU, Zalba G, Díez J. Increased phagocytic nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-dependent superoxide production in patients with early chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.*, 2005; 99: S71–S75.

- [13] Kisic B, Miric D, Dragojevic I, Rasic J, Popovic L. Role of Myeloperoxidase in Patients with Chronic Kidney Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016; 2016: 1069743.
- [14] Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M. IL-10, IL-6, and TNF- $\alpha$ : Central factors in the altered cytokine network of uremia—The good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.*, 2005; 67(4): 1216-1233.
- [15] Granata S, Dalla Gassa A, Tomei P, Lupo A, Zaza G. Mitochondria: a new therapeutic target in chronic kidney disease. *Nutr. Metab. (Lond)*., 2015; 12: 49.
- [16] Gamboa JL, Billings FT, Bojanowski MT, Gilliam LA, Yu C, Roshanravan B, Roberts LJ, Himmelfarb J, Ikizler TA, Brown NJ. Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *Physiol. Rep.*, 2016;4(9): e12780.
- [17] Tbahriti HF, Kaddous A, Bouchenak M, Mekki K. Effect of Different Stages of Chronic Kidney Disease and Renal Replacement Therapies on Oxidant-Antioxidant Balance in Uremic Patients. *Biochem. Res. Int.*, 2013; 2013: 358985
- [18] Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thévenin M, Jaudon MC, Zingraff J, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic. Biol. Med.*, 1996; 21(6): 845-853.
- [19] Anees M, Mumtaz A, Frooqi S, Ibrahim M, Hameed F. Serum trace elements (aluminium, copper, zinc) in hemodialysis patients. *Biomedica.*, 2011; 27(11): 106 – 110.
- [20] Hsieh YY, Shen WS, Lee LY, Wu TL, Ning HC, Sun CF. Long-term changes in trace elements in patients undergoing chronic hemodialysis. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 2006; 109(2): 115-21.
- [21] Eljaoudi R, Errasfa M, Benyahia M, Bahadi A, Cherrah Y, Ibrahimi A, Elkabbaj D. Copper, zinc and selenium imbalance in Moroccan haemodialysis patients and its correlation to lipid peroxidation. *Int. J. Res. Med. Sci.*, 2015; 3(8): 2079-2085.
- [22] Iglesias P, Selgas R, Romero S, Díez J. Selenium and kidney disease. *J. Nephrol.*, 2013; 26(2): 266-272.
- [23] Tonelli M, Wiebe N, Hemmelgarn B, Klarenbach S, Field C, Manns B, Thadhani R, Gill J; Alberta Kidney Disease Network. Trace elements in haemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.*, 2009; 7: 25.



- [24] Milly K, Wit L, Diskin C, Tulley R. Selenium in renal failure patients. *Nephron.*, 1992; 61(2): 139-44.
- [25] Zachara BA, Gromadzinska J, Zbrog Z, Swiech R, Wasowicz W, Twardowska E, Jablonska E, Sobala W. Selenium supplementation to chronic kidney disease patients on hemodialysis does not induce the synthesis of plasma glutathione peroxidase. *Acta Biochim. Pol.*, 2009; 56(1): 183-187.
- [26] Richard MJ, Duclos V, Foret M, Arnaud J, Coudray C, Fusselier M, Favier A. Reversal of selenium and zinc deficiencies in chronic hemodialysis patients by intravenous sodium selenite and zinc gluconate supplementation. *Biol. Trace Elem. Res.*, 1993; 39: 149–159.
- [27] Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.*, 2015; 97: 55-74.
- [28] Montazerifar F, Hashemi M, Karajibani M, Dikshit M. Hemodialysis alters lipid profiles, total antioxidant capacity, and vitamins A, E, and C concentrations in humans. *J. Med. Food.*, 2010; 13(6): 1490-1493.
- [29] Navarro-Alarcon M, Reyes-Pérez A, Lopez-Garcia H, Palomares-Bayo M, Olalla-Herrera M, Lopez-Martinez MC. Longitudinal study of serum zinc and copper levels in haemodialysis patients and their relation to biochemical markers. *Biol Trace Elem Res.* 2006;113(3):209-22.
- [30] Karamouzis I, Sarafidis PA, Karamouzis M, Iliadis S, Haidich AB, Sioulis A, Triantos A, Vavatsi-Christaki N, Grekas DM. Increase in oxidative stress but not in antioxidant capacity with advancing stages of chronic kidney disease. *Am. J. Nephrol.*, 2008; 28(3): 397-404.
- [31] Lin AM, Chen K, Chao P. Antioxidative effect of vitamin D3 on zinc-induced oxidative stress in CNS. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 2005; 1053: 319-29.
- [32] Zhong W, Gu B, Gu Y, Groome LJ, Sun J, Wang Y. Activation of vitamin D receptor promotes VEGF and CuZn-SOD expression in endothelial cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2014; 140: 56-62.
- [33] Kanikarla-Marie P, Jain SK. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> inhibits oxidative stress and monocyte adhesion by mediating the upregulation of GCLC and GSH in endothelial cells treated with acetoacetate (ketosis). *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2016; 159: 94-101
- [34] Nitta K, Nagano N, Tsuchiya K. Fibroblast growth factor 23/klotho axis in chronic kidney disease. *Nephron Clin. Pract.*, 2014; 128 (1-2):1-10.

- [35] Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, Holmes J, Collerone G, Jüppner H, Wolf M. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005; 16(7): 2205-2215.
- [36] Kuo HT, Chen HW, Hsiao HH, Chen HC. Heat shock response protects human peritoneal mesothelial cells from dialysate-induced oxidative stress and mitochondrial injury. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2009; 24(6): 1799-809.
- [37] Cendoroglo M, Sundaram S, Jaber BL, Pereira BJ. Effect of glucose concentration, osmolality, and sterilization process of peritoneal dialysis fluids on cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and polymorphonuclear cell functions in vitro. *Am. J. Kidney. Dis.*, 1998; 31: 273–282.
- [38] Kang E, Kim S, Lee HJ, Park I, Kim H1, Shin GT. Tumor necrosis factor  $\alpha$  is a risk factor for infection in peritoneal dialysis patients. *Korean. J. Intern. Med.*, 2016; 31(4): 722-729.
- [39] Kato S, Chmielewski M, Honda H, Pecoits-Filho R, Matsuo S, Yuzawa Y, Tranaeus A, Stenvinkel P, Lindholm B. Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2008; 3(5): 1526-1533.
- [40] Lemesch S, Ribitsch W, Schilcher G, Spindelböck W, Hafner-Gießauf H, Marsche G, Pasterk L, Payerl D, Schmerböck B, Tawdrous M, Rosenkranz AR, Stiegler P, Kager G, Hallström S, Oettl K, Eberhard K, Horvath A, Leber B, Stadlbauer V. Mode of renal replacement therapy determines endotoxemia and neutrophil dysfunction in chronic kidney disease. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 34534.
- [41] Poppelaars F, Faria B, Gaya da Costa M, Franssen CFM, van Son WJ, Berger SP, Daha MR, Seelen MA. The Complement System in Dialysis: A Forgotten Story? *Front. Immunol.* 2018; 9: 71.
- [42] Nguyen A. T., Lethias C., Zingraff J., Herbelin A., Naret C., Descamps-Latscha B. Hemodialysis membrane-induced activation of phagocyte oxidative metabolism detected in vivo and in vitro within microamounts of whole blood. *Kidney Int.*, 1985; 28(2): 158–167.
- [43] Jankowska M, Rutkowski B, Dębska-Ślizień A. Vitamins and Microelement Bioavailability in Different Stages of Chronic Kidney Disease. *Nutrients.* 2017; 9 (3), e282.
- [44] Tonelli M, Wiebe N, Bello A, Field CJ, Gill JS, Hemmelgarn BR, Holmes DT, Jindal K, Klarenbach SW, Manns BJ, Thadhani R, Kinniburgh D; Alberta Kidney Disease

- Network. Concentrations of Trace Elements in Hemodialysis Patients: A Prospective Cohort Study. *Am. J. Kidney Dis.*, 2017; 70(5): 696-704.
- [45] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.*, 1996; 49: 1304–1313.
- [46] Witko-Sarsat V, Gausson V, Descamps-Latscha B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney Int. Suppl.*, 2003; 84: S11–S14.
- [47] Piwowar A. Aspekty biochemiczne i kliniczne zaawansowanych produktów utleniania białek w chorobach nerek i zaburzeniach metabolicznych. *Postępy. Hig. Med. Dosw.*, 2014; 68: 179-190.
- [48] Grzebyk E, Piwowar A. Modyfikacje glikooksydacyjne albuminy w badaniach medycznych. *Pol. Merk. Lek.*, 2013, XXXIV, 202, 239
- [49] Ward R. A., Ouseph R., McLeish KR. Effects of high-flux hemodialysis on oxidant stress. *Kidney Int.*, 2003; 63(1): 353-359.
- [50] Colombo G, Clerici M, Altomare A, Rusconi F, Giustarini D, Portinaro N, Garavaglia ML, Rossi R, Dalle-Donne I, Milzani A. Thiol oxidation and di-tyrosine formation in human plasma proteins induced by inflammatory concentrations of hypochlorous acid. *J. Proteomics.*, 2017; 152: 22-32.
- [51] Colombo G, Clerici M, Giustarini D, Portinaro N, Badalamenti S, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. A central role for intermolecular dityrosine cross-linking of fibrinogen in high molecular weight advanced oxidation protein product (AOPP) formation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2015; 1850(1): 1-12.
- [52] Selmeçi L. Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? *Free Radic. Res.*, 2011; 45(10): 1115-1123.
- [53] Zhou LL, Cao W, Xie C, Tian J, Zhou Z, Zhou Q, Zhu P, Li A, Liu Y, Miyata T, Hou FF, Nie J. The receptor of advanced glycation end products plays a central role in advanced oxidation protein products-induced podocyte apoptosis. *Kidney Int.*, 2012; 82(7): 759-770.
- [54] Iwao Y, Nakajou K, Nagai R, Kitamura K, Anraku M, Maruyama T, Otagiri M. CD36 is one of important receptors promoting renal tubular injury by advanced oxidation protein products. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2008; 295(6): F1871-1880.

- [55] Cao W, Xu J, Zhou ZM, Wang GB, Hou FF, Nie J. Advanced oxidation protein products activate intrarenal renin-angiotensin system via a CD36-mediated, redox-dependent pathway. *Antioxid. Redox Signal.*, 2013; 18(1): 19-35.
- [56] Wei XF, Zhou QG, Hou FF, Liu BY, Liang M. Advanced oxidation protein products induce mesangial cell perturbation through PKC-dependent activation of NADPH oxidase. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2009; 296(2): F427-437.
- [57] Li X, Xu L, Hou X, Geng J, Tian J, Liu X, Bai X. Advanced oxidation protein products aggravate tubulointerstitial fibrosis through PKC-dependent mitochondrial injury in early diabetic nephropathy. *Antioxid. Redox Signal.*, 2019; 30(9): 1162-1185.
- [58] Warwas M, Piwowar A, Kopiec G. Zaawansowane produkty glikacji (AGE) w organizmie – powstawanie, losy, interakcja z receptorami i jej następstwa. *Pat. Chorób.*, 2010; 88(8): 585-590.
- [59] Weiss MF, Erhard P, Kader-Attia FA, Wu YC, Deoreo PB, Araki A, Glomb MA, Monnier VM. Mechanisms for the formation of glycoxidation products in end-stage renal disease. *Kidney Int.*, 2000; 57(6): 2571-2585.
- [60] Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic. Res.*, 2013; Suppl 1; 47: 3-27.
- [61] Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K, Baynes JW. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int.*, 1999; 55(2): 389-399.
- [62] Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation end product, Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *Biol. Chem.*, 1996; 271(17): 9982-9986.
- [[63] Miyata T, Fu MX, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Thorpe SR, Baynes JW. Autoxidation products of both carbohydrates and lipids are increased in uremic plasma: is there oxidative stress in uremia? *Kidney Int.*, 1998; 54(4) :1290-1295
- [64] Brings S, Fleming T, Freichel M, Muckenthaler MU, Herzig S, Nawroth PP. Dicarboxyls and Advanced Glycation End-Products in the Development of Diabetic Complications and Targets for Intervention. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017; 18(5): e984.
- [65] Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications. *Kidney Int. Suppl.*, 2000; 76: S120-125.

- [66] Dhar A, Dhar I, Desai KM, Wu L. Methylglyoxal scavengers attenuate endothelial dysfunction induced by methylglyoxal and high concentrations of glucose. *Br. J. Pharmacol.*, 2010; 161(8): 1843-1856.
- [67] Rabbani N, Thornalley PJ. Dicarbonyls linked to damage in the powerhouse: glycation of mitochondrial proteins and oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.*, 2008; 36: 1045-1050.
- [68] Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2001; 280(5): E685-694.
- [69] Wang X, Yu S, Wang CY, Wang Y, Liu HX, Cui Y, Zhang LD. Advanced glycation end products induce oxidative stress and mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 2015; 51(2): 204-209.
- [70] Prasad K, Mishra M. AGE-RAGE Stress, Stressors, and Antistressors in Health and Disease *Int. J. Angiol.*/ 2018; 27(1): 1-12.
- [71] Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc/ Natl/ Acad/ Sci/ USA.*, 1994; 91(24): 11704-11708.
- [72] De Vriese AS, Tilton RG, Mortier S, Lameire NH. Myofibroblast transdifferentiation of mesothelial cells is mediated by RAGE and contributes to peritoneal fibrosis in uraemia. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2006; 21(9): 2549-2555.
- [73] Miyata T, Oda O, Inagi R, Iida Y, Araki N, Yamada N, Horiuchi S, Taniguchi N, Maeda K, Kinoshita T. Beta 2-Microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis. *J. Clin. Invest.*, 1993; 92(3): 1243-1252.
- [74] Ambrożewicz E, Bielawska K. Karbonylacja białek - przyczyny, skutki i sposoby oceny. *Postepy Biochem.*, 2016; 62(4): 495-505.
- [75] Semchyshyn HM, Lushchak VI (April 25th 2012). *Interplay Between Oxidative and Carbonyl Stresses: Molecular Mechanisms, Biological Effects and Therapeutic Strategies of Protection, Oxidative Stress* Volodymyr Lushchak and Halyna M. Semchyshyn, IntechOpen, 2012.
- [76] Gajjala PR, Fliser D2, Speer T, Jankowski V, Jankowski J. Emerging role of post-translational modifications in chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2015; 30(11): 1814-1824.

- [77] Hauck AK, Bernlohr DA. Oxidative stress and lipotoxicity. *J. Lipid Res.*, 2016; 57(11): 1976-1986.
- [78] Pietkiewicz J, Seweryn E, Bartyś A, Gamian A. Receptory końcowych produktów zaawansowanej glikacji – znaczenie fizjologiczne i kliniczne. *Postepy. Hig. Med. Dosw.*, (Online). 2008;62: 511-523
- [79] Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, Inoko H, Ikemura T. Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics.*, 1994; 23(2): 408-419.
- [80] Prasad K, Dhar I, Zhou Q, Elmoselhi H, Shoker M, Shoker A. AGEs/sRAGE, a novel risk factor in the pathogenesis of end-stage renal disease. *Mol. Cell. Biochem.*, 2016; 423(1-2): 105-114.
- [81] Koyama H, Shoji T, Yokoyama H, Motoyama K, Mori K, Fukumoto S, Emoto M, Shoji T, Tamei H, Matsuki H, Sakurai S, Yamamoto Y, Yonekura H, Watanabe T, Yamamoto H, Nishizawa Y. Plasma level of endogenous secretory RAGE is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005; 25(12): 2587-2593.
- [82] Xie J, Burz DS, He W, Bronstein IB, Lednev I, Shekhtman A. Hexameric calgranulin C (S100A12) binds to the receptor for advanced glycated end products (RAGE) using symmetric hydrophobic target-binding patches. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282(6): 4218-4231.
- [83] Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, Suffredini AF. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood.*, 2003; 101(7): 2652-2660.
- [84] Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016; 2016: 5698931.
- [85] Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res.*, 2011; 21(1): 103-115.
- [86] Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272(26): 16498-16506.

- [87] Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2001; 280(5): E685-694.
- [88] Ponczek MB, Wachowicz B. Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami. *Postepy Biochem.*. 2005; 51(2): 140-145.
- [89] Szuba A, Wojtaszek P. Modyfikacje strukturalne białek wywołane przez tlenek azotu. *Postepy Biochem.*. 2010; 56(2): 107-114.
- [90] Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.*, 1996; 271: C1424-1437.
- [91] Cipak Gasparovic A, Zarkovic N, Zarkovic K, Semen K, Kaminsky D, Yelisyeyeva O, Bottari SP. Biomarkers of oxidative and nitro-oxidative stress: conventional and novel approaches. *Br. J. Pharmacol.*, 2017; 174(12): 1771-1783.
- [92] Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2004; 101(12): 4003-4008.
- [93] Piroddi M1, Palmese A, Pilolli F, Amoresano A, Pucci P, Ronco C, Galli F. Plasma nitroproteome of kidney disease patients. *Amino Acids.*, 2011; 40(2): 653-667.
- [94] Bartesaghi S, Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol.*, 2018; 14: 618-625.
- [95] Brennan ML, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, Vadseth C, Narine L, Lenkiewicz E, Borchers MT, Lusic AJ, Lee JJ, Lee NA, Abu-Soud HM, Ischiropoulos H, Hazen SL. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277(20): 17415-17427.
- [96] Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid. Redox Signal.*, 2016; 25(3): 119-146.
- [97] MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1996; 93(21): 11853-11858.
- [98] Albrecht EW, Stegeman CA, Tiebosch AT, Tegzess AM, van Goor H. Expression of inducible and endothelial nitric oxide synthases, formation of peroxynitrite and reactive oxygen species in human chronic renal transplant failure. *Am. J. Transplant.*, 2002; 2(5): 448-453.

- [99] Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Liang K, Pandian R. Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. *Hypertension.*, 2002; 39(1): 135-141.
- [100] Szalay CI, Erdélyi K, Kökény G, Lajtár E, Godó M, Révész C, Kaucsár T, Kiss N, Sárközy M, Csont T, Krenács T, Szénási G, Pacher P, Hamar P. Oxidative/Nitrative Stress and Inflammation Drive Progression of Doxorubicin-Induced Renal Fibrosis in Rats as Revealed by Comparing a Normal and a Fibrosis-Resistant Rat Strain. *PLoS One.*, 2015 18; 10(6): e0127090.
- [101] Tyther R, Ahmeda A, Johns E, Sheehan D. Proteomic identification of tyrosine nitration targets in kidney of spontaneously hypertensive rats. *Proteomics.*, 2007; 7(24): 4555-4564.
- [102] Stark GR, Stein WH, Moore S. Reactions of the cyanate present in aqueous urea with amino acids and proteins. *J. Biol. Chem.*, 1960; 235: 3177-3181.
- [103] Nilsson L, Lundquist P, Kagedal B, Larsson R. Plasma cyanate concentrations in chronic kidney failure. *Clin. Chem.*, 1996; 42: 484-484
- [104] Davies MJ. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2011; 48(1): 8-19.
- [105] Jaisson S, Pietrement C, Gillery P. Carbamylation-derived products: bioactive compounds and potential biomarkers in chronic kidney failure and atherosclerosis. *Clin. Chem.*, 2011; 57: 1499-1505.
- [106] Pieniążek A, Gwoździński K. Karbamyłacja białek – mechanizmy, przyczyny i skutki. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online).*, 2016; 70: 514-521.
- [107] Kraus LM, Kraus AP Jr. Carbamoylation of amino acids and proteins in uremia. *Kidney Int. Suppl.*, 2001; 78: S102-S107.
- [108] Gross ML, Piecha G, Bierhaus A, Hanke W, Henle T, Schirmacher P, Ritz E. Glycated and carbamylated albumin are more "nephrotoxic" than unmodified albumin in the amphibian kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2011; 301(3): F476-485.
- [109] Shaykh M, Pegoraro AA, Mo W, Arruda JA, Dunea G, Singh AK. Carbamylated proteins activate glomerular mesangial cells and stimulate collagen deposition. *J. Lab. Clin. Med.*, 1999 Mar;133(3):302-8.
- [110] Kraus LM, Gaber L, Handorf CR, Marti HP, Kraus AP Jr. Carbamoylation of glomerular and tubular proteins in patients with kidney failure: a potential mechanism of ongoing renal damage. *Swiss Med. Wkly.*, 2001; 131(11-12): 139-144.



- [111] Pieniżek A, Gwoździński K. Carbamylation of proteins leads to alterations in the membrane structure of erythrocytes. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2003; 8: 127-131.
- [112] Pietrement C1, Gorisse L, Jaisson S, Gillery P. Chronic increase of urea leads to carbamylated proteins accumulation in tissues in a mouse model of CKD. *PLoS One.*, 2013; 8(12): e82506.
- [113] Jaisson S, Larreta-Garde V, Bellon G, Hornebeck W, Garnotel R, Gillery P. Carbamylation differentially alters type I collagen sensitivity to various collagenases. *Matrix Biol.*, 2007; 26(3): 190-196.
- [114] Jaisson S., Lorimier S., Ricard-Blum S., Sockalingum G.D., Delevallée -Forte C., Kegelaer G., Manfait M., Garnotel R., Gillery P. Impact of carbamylation on type I collagen conformational structure and its ability to activate human polymorphonuclear neutrophils. *Chem. Biol.*, 2006; 13: 149-159.
- [115] Holy EW, Akhmedov A, Speer T, Camici GG, Zewinger S, Bonetti N, Beer JH, Lüscher TF, Tanner FC. Carbamylated Low-Density Lipoproteins Induce a Prothrombotic State Via LOX-1: Impact on Arterial Thrombus Formation In Vivo. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2016; 68(15): 1664-1676.
- [116] Binder V, Bergum B, Jaisson S, Gillery P, Scavenius C, Spriet E, Nyhaug AK, Roberts HM, Chapple ILC, Hellvard A, Delaleu N, Mydel P. Impact of fibrinogen carbamylation on fibrin clot formation and stability. *Thromb. Haemost.*, 2017; 117(5): 899-910.
- [117] Jaisson S, Delevallée-Forte C, Touré F, Rieu P., Garnotel R., Gillery P. Carbamylated albumin is a potent inhibitor of polymorphonuclear neutrophil respiratory burst. *FEBS Lett.*, 2007; 581: 1509-1513
- [118] Hodkova M, Dusilova-Sulkova S, Skalicka A, Kalousova M, Zima T., Bartunkova J. Influence of parenteral iron therapy and oral vitamin E supplementation on neutrophil respiratory burst in chronic hemodialysis patients. *Renal Failure.*, 2005; 27(2): 135–141.
- [119] Sakata T, Furuya R, Shimazu T, Odamaki M., Ohkawa S., Kumagai H. Coenzyme Q10 administration suppresses both oxidative and antioxidative markers in hemodialysis patients. *Blood Purif.*, 2008; 26(4): 371-378.
- [120] Ward R A., Ouseph R, McLeish K. R. Effects of high-flux hemodialysis on oxidant stress. *Kidney Int.*, 2003; 63(1): 353-359.
- [121] Fragedaki E, Nebel M, Schupp N, Sebekova K, Völkel W, Klassen A, Pischetsrieder M, Frischmann M, Niwa T, Vienken J, Heidland A, Stopper H. Genomic damage and

- circulating AGE levels in patients undergoing daily versus standard haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2005; 20(9): 1936-1943.
- [122] Furuya R, Kumagai H, Odamaki M, Takahashi M, Miyaki A, Hishida A. Impact of residual renal function on plasma levels of advanced oxidation protein products and pentosidine in peritoneal dialysis patients. *Nephron Clin. Pract.*, 2009; 112(4): c255-261.
- [123] Gonzalez E, Bajo MA<sup>1</sup>, Carrero JJ, Lindholm B, Grande C, Sánchez-Villanueva R, Del Peso G, Díaz-Almirón M, Iglesias P, Díez JJ, Selgas R. An Increase of Plasma Advanced Oxidation Protein Products Levels Is Associated with Cardiovascular Risk in Incident Peritoneal Dialysis Patients: A Pilot Study. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2015; 2015: 219569.
- [124] Kalousová M, Zima T, Tesar V, Lachmanová J. Advanced glycation end products and advanced oxidation protein products in hemodialyzed patients. *Blood Purif.*, 2002; 20(6): 531-6.
- [125] Kuchta A, Pacanis A, Kortas-Stempak B, Cwiklińska A, Ziętkiewicz M, Renke M, Rutkowski B. Estimation of oxidative stress markers in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press. Res.*, 11; 34(1): 12-29.
- [126] Wu CC, Chen JS, Wu WM, Liao TN, Chu P, Lin SH, Chuang CH, Lin YF. Myeloperoxidase serves as a marker of oxidative stress during single haemodialysis session using two different biocompatible dialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant.*, 2005; 20(6): 1134-1139.
- [127] Boulanger E, Moranne O, Wautier MP, Witko-Sarsat V, Descamps-Latscha B, Kandoussi A, Grossin N, Wautier JL. Changes in glycation and oxidation markers in patients starting peritoneal dialysis: a pilot study. *Perit Dial Int.*, 2006; 26(2): 207-212.
- [128] Marques de Mattos A, Marino LV, Ovidio PP, Jordão AA, Almeida CC, Chiarello PG. Protein oxidative stress and dyslipidemia in dialysis patients. *Ther. Apher. Dial.*, 2012; 16(1): 68-74.
- [129] Marques de Mattos A, Afonso Jordão A, Abrão Cardeal da Costa J, Garcia Chiarello P.A Study of Protein Oxidative Stress, Antioxidant Vitamins and Inflammation in Patients Undergoing either Hemodialysis or Peritoneal Dialysis. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 2014; 84(5-6): 261-8.
- [130] Zhou Q, Wu S, Jiang J, Tian J, Chen J, Yu X, Chen P, Mei C, Xiong F, Shi W, Zhou W, Liu X, Sun S, Xie DI, Liu J, Xu X, Liang M, Hou F. Accumulation of circulating advanced oxidation protein products is an independent risk factor for ischaemic heart

- disease in maintenance haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)*, 2012; 17(7): 642-649.
- [131] Kocak H, Gumuslu S, Sahin E, Ceken K, Gocmen YA, Yakupoglu G, Ersoy FF, Tuncer M. Advanced oxidative protein products are independently associated with endothelial function in peritoneal dialysis patients. *Nephrology (Carlton)*, 2009; 14(3): 273-80.
- [132] Kocak H, Gumuslu S, Ermis C, Mahsereci E, Sahin E, Gocmen AY, Ersoy F, Suleymanlar G, Yakupoglu G, Tuncer M. Oxidative stress and asymmetric dimethylarginine is independently associated with carotid intima media thickness in peritoneal dialysis patients. *Am. J. Nephrol.*, 2008; 28(1): 91-96.
- [133] Machowska A, Sun J, Qureshi AR, Isoyama N, Leurs P, Anderstam B, Heimbürger O, Barany P, Stenvinkel P, Lindholm B. Plasma Pentosidine and Its Association with Mortality in Patients with Chronic Kidney Disease. *PLoS One.*, 2016; 11(10): e0163826.
- [134] Boulanger E, Wautier MP, Wautier JL, Boval B, Panis Y, Wernert N, Danze PM, Dequiedt P. AGEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression. *Kidney Int.*, 2002; 61(1): 148-156.
- [135] Weiss MF, Erhard P, Kader-Attia FA, Wu YC, Deoreo PB, Araki A, Glomb MA, Monnier VM. Mechanisms for the formation of glycoxidation products in end-stage renal disease. *Kidney Int.*, 2000; 57(6): 2571-2585.
- [136] Sebeková K, Podracká L, Heidland A, Schinzel R. Enhanced plasma levels of advanced glycation end products (AGE) and pro-inflammatory cytokines in children/adolescents with chronic renal insufficiency and after renal replacement therapy by dialysis and transplantation--are they inter-related? *Clin Nephrol.*, 2001; 56(6): S21-26.
- [137] Schwedler SB, Metzger T, Schinzel R, Wanner C. Advanced glycation end products and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.*, 2002; 62(1): 301-310.
- [138] Machowska A, Sun J, Qureshi AR, Isoyama N, Leurs P, Anderstam B, Heimbürger O, Barany P, Stenvinkel P, Lindholm B. Plasma Pentosidine and Its Association with Mortality in Patients with Chronic Kidney Disease. *PLoS One.*, 2016; 11(10): e0163826.
- [139] Nakayama K, Nakayama M, Iwabuchi M, Terawaki H, Sato T, Kohno M, Ito S. Plasma alpha-oxoaldehyde levels in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease patients. *Am. J. Nephrol.*, 2008; 28(6): 871-878.

- [140] Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by Advanced Glycation End-products (AGEs) links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2001; 280: E685-E694.
- [141] Agalou S, Ahmed N, Dawnay A, Thornalley PJ. Removal of advanced glycation end products in clinical renal failure by peritoneal dialysis and haemodialysis. *Biochem. Soc. Trans.*, 2003; 31: 1394-1396.
- [142] Stopper H, Schinzel R, Sebekova K, Heidland A. Genotoxicity of advanced glycation end products in mammalian cells. *Cancer Lett.*, 2003; 190(2): 151-156.
- [143] Zhang Z, Dmitrieva NI, Park JH, Levine RL, Burg MB. High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2004; 101(25): 9491-9496.
- [144] Mera K, Anraku M, Kitamura K, Nakajou K, Maruyama T, Otagiri M. The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: Its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 334(4): 1322-1328.
- [145] Anraku M, Kitamura K, Shinohara A, Adachi M, Suenga A, Maruyama T, Miyataka K, Miyoshi T, Shiraishi N, Nonoguchi H, Otagiri M, Tomita K. Intravenous iron administration induces oxidation of serum albumin in hemodialysis patients. *Kidney Int.*, 2004; 66(2): 841-848.
- [146] Haklar G, Yeğenağa I, Yalçın AS. Evaluation of oxidant stress in chronic hemodialysis patients: use of different parameters. *Clin. Chim. Acta.*, 1995; 234(1-2): 109-114.
- [147] Puchades MJ, Saez G, Muñoz MC, Gonzalez M, Torregrosa I, Juan I, Miguel A. Study of oxidative stress in patients with advanced renal disease and undergoing either hemodialysis or peritoneal dialysis. *Clin Nephrol.*, 2013; 80(3): 177-186.
- [148] Mitrogianni Z, Barbouti A, Galaris D, Siamopoulos KC. Oxidative modification of albumin in predialysis, hemodialysis, and peritoneal dialysis patients. *Nephron Clin. Pract.*, 2009; 113(3): c234-240.
- [149] Boudouris G, Verginadis II, Simos YV, Zouridakis A, Ragos V, Karkabounas SCh, Evangelou AM. Oxidative stress in patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and the significant role of vitamin C and E supplementation. *Int. Urol. Nephrol.*, 2013; 45(4): 1137-1144.

- [150] Doñate T, Herreros A, Martinez E, Martinez J, Andrés E, Cabezas A, Ortiz A, de Prado A, Pou JM, Pamplona R, Portero Otin M, Bellmunt MJ. Protein oxidative stress in dialysis patients. *Adv. Perit, Dial.*, 2002; 18: 15-27.
- [151] Aveles PR, Criminácio CR, Gonçalves S, Bignelli AT, Claro LM, Siqueira SS, Nakao LS, Pecoits-Filho R. Association between biomarkers of carbonyl stress with increased systemic inflammatory response in different stages of chronic kidney disease and after renal transplantation. *Nephron Clin. Pract.*, 2010; 116(4): c294-299.
- [152] Pavone B, Sirolli V, Bucci S, Libardi F, Felaco P, Amoroso L, Sacchetta P, Urbani A, Bonomini M. Adsorption and carbonylation of plasma proteins by dialyser membrane material: in vitro and in vivo proteomics investigations. *Blood Transfus.*, 2010; 8 Suppl 3: 113-119.
- [153] Mayer B, Zitta S, Greilberger J, Holzer H, Reibnegger G, Hermetter A, Oetl K. Effect of hemodialysis on the antioxidative properties of serum. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2003; 1638(3): 267-72.
- [154] Semba RD, Ferrucci L, Fink JC, Sun K, Beck J, Dalal M, Guralnik JM, Fried LP. Advanced glycation end products and their circulating receptors and level of kidney function in older community-dwelling women. *Am. J. Kidney Dis.*, 2009; 53(1): 51-58.
- [155] Kalousová M, Hodková M, Kazderová M, Fialová J, Tesar V, Dusilová-Sulková S, Zima T. Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *Am. J. Kidney Dis.*, 2006; 47(3): 406-411.
- [156] Rebholz CM, Astor BC, Grams ME, Halushka MK, Lazo M, Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Coresh J, Selvin E. Association of plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and risk of kidney disease: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2015; 30(1): 77-83.
- [157] Basta G, Leonardis D, Mallamaci F, Cutrupi S, Pizzini P, Gaetano L, Tripepi R, Tripepi G, De Caterina R, Zoccali C. Circulating soluble receptor of advanced glycation end product inversely correlates with atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. *Kidney. Int.*, 2010; 77(3): 225-231.
- [158] Kim JK, Park S, Lee MJ, Song YR, Han SH, Kim SG, Kang SW, Choi KH, Kim HJ, Yoo TH. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and proinflammatory ligand for RAGE (EN-RAGE) are associated with carotid atherosclerosis in patients with peritoneal dialysis. *Atherosclerosis.*, 2012; 220(1): 208-214.

- [159] Isoyama N, Leurs P, Qureshi AR, Bruchfeld A, Anderstam B, Heimbürger O, Bárányi P, Stenvinkel P, Lindholm B. Plasma S100A12 and soluble receptor of advanced glycation end product levels and mortality in chronic kidney disease Stage 5 patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2015; 30(1): 84-91.
- [160] Dalal M, Semba RD, Sun K, Crasto C, Varadhan R, Bandinelli S, Fink JC, Guralnik JM, Ferrucci L. Endogenous secretory receptor for advanced glycation end products and chronic kidney disease in the elderly population. *Am. J. Nephrol.*, 2011; 33(4): 313-318.
- [161] Kalousová M, Jáchymová M, Mestek O, Hodková M, Kazderová M, Tesar V, Zima T. Receptor for advanced glycation end products--soluble form and gene polymorphisms in chronic haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2007; 22(7): 2020-2026.
- [162] Stinghen AE, Massy ZA, Vlassara H, Striker GE, Boullier A. Uremic Toxicity of Advanced Glycation End Products in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2016; 27(2): 354-370.
- [163] Abel M, Ritthaler U, Zhang Y, Deng Y, Schmidt AM, Greten J, Sernau T, Wahl P, Andrassy K, Ritz E, et al. Expression of receptors for advanced glycosylated end-products in renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 1995; 10(9): 1662-1667.
- [164] Tanji N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM, D'Agati VD. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2000; 11(9): 1656-1666.
- [165] Shah SV, Apostolov EO, Ok E, Basnakian AG. Novel mechanisms in accelerated atherosclerosis in kidney disease. *J. Ren. Nutr.*, 2008; 18(1): 65-69.
- [166] Namiduru ES, Tarakcioglu M, Tiryaki O, Usalan C. Evaluation of oxidative and nitrosative stress in hemodialysis patients. *Minerva Med.*, 2010; 101(5): 305-10
- [167] Köse FA, Seziş M, Akçiçek F, Pabuççuoğlu A. Oxidative and nitrosative stress markers in patients on hemodialysis and peritoneal dialysis. *Blood Purif.* 2011; 32(3): 202-208.
- [168] Mitrogianni Z, Barbouti A, Galaris D, Siamopoulos KC. Tyrosine nitration in plasma proteins from patients undergoing hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis.*, 2004; 44(2): 286-292.
- [169] Massy ZA, Borderie D, Nguyen-Khoa T, Drüeke TB, Ekindjian OG, Lacour B. Increased plasma S-nitrosothiol levels in chronic haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2003; 18(1): 153-157.

- [170] Bakillah A, Tedla F, Ayoub I, John D, Norin AJ, Hussain MM, Brown C. Plasma Nitration of High-Density and Low-Density Lipoproteins in Chronic Kidney Disease Patients. Receiving Kidney Transplants. *Mediators Inflamm.*, 2015; 2015: 352356.
- [171] Berg AH, Drechsler C, Wenger J, Buccafusca R, Hod T, Kalim S, Ramma W, Parikh SM, Steen H, Friedman DJ, Danziger J, Wanner C, Thadhani R, Karumanchi SA. Carbamylation of serum albumin as a risk factor for mortality in patients with kidney failure. *Sci. Transl. Med.*, 2013; 5(175): 175.
- [172] Hasuike Y, Nakanishi T, Maeda K, Tanaka T, Inoue T, Takamitsu Y. Carbamylated hemoglobin as a therapeutic marker in hemodialysis. *Nephron.*, 2002; 91(2): 228-234.
- [173] Drechsler C, Kalim S, Wenger JB, Suntharalingam P, Hod T, Thadhani RI, Karumanchi SA, Wanner C, Berg AH. Protein carbamylation is associated with heart failure and mortality in diabetic patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.*, 2015; 87(6): 1201-1208.
- [174] Koeth RA, Kalantar-Zadeh K, Wang Z, Fu X, Tang WH, Hazen SL. Protein carbamylation predicts mortality in ESRD. *J Am Soc Nephrol.* 2013; 24(5): 853-861.
- [175] Balion CM, Draisey TF, Thibert RJ. Carbamylated hemoglobin and carbamylated plasma protein in hemodialyzed patients. *Kidney Int.*, 1998; 53(2): 488-495.
- [176] Davenport A, Jones S, Goel S, Astley JP, Feest TG. Carbamylated hemoglobin: a potential marker for the adequacy of hemodialysis therapy in end-stage renal failure. *Kidney Int.*, 1996; 50(4): 1344-1351.
- [177] Tarif N, Shaykh M, Stim J, Arruda JA, Dunea G. Carbamylated hemoglobin in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.*, 1997; 30(3): 361-365.
- [178] Kairaitis LK, Yuill E, Harris DC. Determinants of haemoglobin carbamylation in haemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2000; 15(9): 1431-1437.
- [179] Tang WH, Shrestha K, Wang Z, Borowski AG, Troughton RW, Klein AL, Hazen SL. Protein carbamylation in chronic systolic heart failure: relationship with renal impairment and adverse long-term outcomes. *J. Card. Fail.*, 2013; 19(4): 219-224.
- [180] Cipak Gasparovic A, Zarkovic N, Zarkovic K, et al. Biomarkers of oxidative and nitro-oxidative stress: conventional and novel approaches. *Br. J. Pharmacol.*, 2017; 174(12): 1771–1783.
- [181] Ationu A. Carbamylation and glycosylation of haemoglobin in vitro: effects of cyanate and glucose. *Med. Lab. Sci.*, 1992; 49(1): 34-37.

- [182] Nicolas C, Jaisson S, Gorisse L, Tessier FJ, Niquet-Léridon C, Jacolot P, Pietrement C, Gillery P. Carbamylation is a competitor of glycation for protein modification in vivo. *Diabetes Metab.*, 2018; 44(2): 160-167.
- [183] Gillery P, Jaisson S. Usefulness of non-enzymatic post-translational modification derived products (PTMDPs) as biomarkers of chronic diseases. *J. Proteomics.*, 2013; 92: 228-238.
- [184] Shiu SW, Xiao SM, Wong Y, Chow WS, Lam KS, Tan KC. Carbamylation of LDL and its relationship with myeloperoxidase in type 2 diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond.)*, 2014; 126(2): 175-181.
- [185] Rhode H, Muckova P, Büchler R, Wendler S, Tautkus B, Vogel M, Moore T, Grosskreutz J, Klemm A, Nabity M. A next generation setup for pre-fractionation of non-denatured proteins reveals diverse albumin proteoforms each carrying several post-translational modifications. *Sci. Rep.*, 2019; 9(1): 11733.
- [186] Kalim S, Trottier CA, Wenger JB, Wibecan J, Ahmed R, Ankers E, Karumanchi SA, Thadhani R, Berg AH. Longitudinal Changes in Protein Carbamylation and Mortality Risk after Initiation of Hemodialysis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2016; 11(10): 1809-1816.
- [187] Perl J, Kalim S, Wald R, Goldstein MB, Yan AT, Noori N, Kiaii M, Wenger J, Chan C, Thadhani RI, Karumanchi SA, Berg AH. Reduction of carbamylated albumin by extended hemodialysis. *Hemodial. Int.*, 2016; 20(4): 510-521.
- [188] Trottier C, Perl J, Freeman M, Thadhani R, Berg A, Kalim S. Protein Carbamylation in Peritoneal Dialysis and the Effect of Low Glucose Plus Amino Acid Solutions. *Perit. Dial. Int.*, 2018; 38(2): 149-152.
- [189] Kopple JD. Pathophysiology of protein-energy wasting in chronic renal failure. *J. Nutr.*, 1994; 129: 147-251.
- [190] Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif.*, 2015; 39(1-3): 84-92.
- [191] Granata S, Masola V, Zoratti E, Scupoli MT, Baruzzi A, Messa M, Sallustio F, Gesualdo L, Lupo A, Zaza G. NLRP3 inflammasome activation in dialyzed chronic kidney disease patients. *PLoS One.*, 2015; 10(3), :e0122272.
- [192] Spoto B, Pisano A, Zoccali C. Insulin resistance in chronic kidney disease: a systematic review. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2016; 311(6): F1087-F1108



- [193] Kalim S, Ortiz G, Trottier CA, Deferio JJ, Karumanchi SA, Thadhani RI, Berg AH. The Effects of Parenteral Amino Acid Therapy on Protein Carbamylation in Maintenance Hemodialysis Patients. *J. Ren. Nutr.*, 2015; 25(4): 388-392.
- [194] Jin K. Effects of amino acids and albumin on erythropoietin carbamoylation. *Clin. Exp. Nephrol.*, 2013; 17: 575-581
- [195] Busch M, Franke S, Müller A, Wolf M, Gerth J, Ott U, Niwa T, Stein G. Potential cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: AGEs, total homocysteine and metabolites, and the C-reactive protein. *Kidney Int.*, 2004; 66(1): 338-347
- [196] Weiss MF, Scivittaro V, Anderson JM. Oxidative stress and increased expression of growth factors in lesions of failed hemodialysis access. *Am. J. Kidney Dis.*, 2001; 37(5): 970-980.
- [197] Kalousová M, Sulková S, Fialová L, Soukupová J, Malbohan IM, Spacek P, Braun M, Mikulíková L, Fortová M, Horejsí M, Tesar V, Zima T. Glycooxidation and inflammation in chronic haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2003; 18(12): 2577-2581.
- [198] Uchimura T, Motomiya Y, Okamura H, Hashiguchi T, Miura M, Uji Y, Iwamoto H, Maruyama I. Marked increases in macrophage colony-stimulating factor and interleukin-18 in maintenance hemodialysis patients: comparative study of advanced glycation end products, carboxymethyllysine and pentosidine. *Nephron.*, 2002; 90(4): 401-407.
- [199] Dahwa R, Fassett RG, Wang Z, Briskey D, Mallard AR, Coombes JS. Variability of oxidative stress biomarkers in hemodialysis patients. *Biomarkers.*, 2014; 19(2): 154-158.
- [200] Danielski M, Ikizler TA, McMonagle E, Kane JC, Pupim L, Morrow J, Himmelfarb J. Linkage of hypoalbuminemia, inflammation, and oxidative stress in patients receiving maintenance hemodialysis therapy. *Am. J. Kidney Dis.*, 2003; 42(2): 286-94.
- [201] Guo CH, Wang CL, Chen PC, Yang TC. Linkage of some trace elements, peripheral blood lymphocytes, inflammation, and oxidative stress in patients undergoing either hemodialysis or peritoneal dialysis. *Perit. Dial. Int.*, 2011; 31(5): 583-591.
- [202] Koyama H, Shoji T, Fukumoto S, Shinohara K, Shoji T, Emoto M, Mori K, Tahara H, Ishimura E, Kakiya R, Tabata T, Yamamoto H, Nishizawa Y. Low circulating endogenous secretory receptor for AGEs predicts cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.*, 2007; 27(1): 147-153.

- [203] Jung ES, Chung W, Kim AJ, Ro H, Chang JH, Lee HH, Jung JY. Associations between Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (sRAGE) and S100A12 (EN-RAGE) with Mortality in Long-term Hemodialysis Patients. *J. Korean Med. Sci.*, 2017; 32(1): 54-59.
- [204] Nakashima A, Carrero JJ, Qureshi AR, Miyamoto T, Anderstam B, Bárány P, Heimbürger O, Stenvinkel P, Lindholm B. Effect of circulating soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and the proinflammatory RAGE ligand (EN-RAGE, S100A12) on mortality in hemodialysis patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2010; 5(12): 2213-9.
- [205] Kazancıoğlu R. Risk factors for chronic kidney disease: an update. *Kidney Int. Suppl.*, (2011). 2013; 3(4): 368–371.
- [206] Mathew RO, Bangalore S, Lavelle MP, Pellikka PA, Sidhu MS, Boden WE, Asif A. Diagnosis and management of atherosclerotic cardiovascular disease in chronic kidney disease: a review. *Kidney Int.*, 2017; 91(4): 797-807.
- [207] Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N, European Uremic Toxin Work Group. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Dial. Transplant.*, 2005; 20(6): 1048–1056.
- [208] Vaziri ND, Norris K. Lipid disorders and their relevance to outcomes in chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2011; 31(1-3): 189-96.
- [209] Moradi H, Pahl MV, Elahimehr R, Vaziri ND. Impaired antioxidant activity of high-density lipoprotein in chronic kidney disease. *Transl. Res.*, 2009; 153(2): 77-85.
- [210] Florens N, Calzada C, Lyasko E, Juillard L, Soulage CO. Modified Lipids and Lipoproteins in Chronic Kidney Disease: A New Class of Uremic Toxins. *Toxins (Basel)*, 2016; 8(12): E376.
- [211] Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm.*, 2013; 2013: 152786.
- [212] Exner M, Hermann M, Hofbauer R, Hartmann B, Kapiotis S, Gmeiner B. Thiocyanate catalyzes myeloperoxidase-initiated lipid oxidation in LDL. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 37(2): 146-155.
- [213] Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP, Cohen PA, Frazier WA, Hoff HF, Hazen SL. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J. Clin. Invest.*, 2000; 105(8): 1095-108.

- [214] Duni A, Liakopoulos V, Rapsomanikis KP, Dounousi E. Kidney Disease and Disproportionally Increased Cardiovascular Damage: Does Oxidative Stress Explain the Burden? *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2017; 2017: 9036450.
- [215] Chmielewski M, Bryl E, Marzec L, Aleksandrowicz E, Witkowski JM, Rutkowski B. Expression of scavenger receptor CD36 in chronic renal failure patients. *Artif. Organs.*, 2005; 29: 608–614.
- [216] Kon V, Linton MF, Fazio S. Atherosclerosis in chronic kidney disease: the role of macrophages. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2011; 7(1): 45-54.
- [217] Guo ZJ, Niu HX, Hou FF, Zhang L, Fu N, Nagai R, Lu X, Chen BH, Shan YX, Tian JW, Nagaraj RH, Xie D, Zhang X. Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2008; 10(10): 1699-1712.
- [218] Marsche G, Frank S, Hrzenjak A, Holzer M, Dirnberger S, Wadsack C, Scharnagl H, Stojakovic T, Heinemann A, Oettl K. Plasma-advanced oxidation protein products are potent high-density lipoprotein receptor antagonists in vivo. *Circ. Res.*, 2009; 104(6): 750-757.
- [219] Marsche G, Frank S, Hrzenjak A, Holzer M, Dirnberger S, Wadsack C, Scharnagl H, Stojakovic T, Heinemann A, Oettl K. Plasma-advanced oxidation protein products are potent high-density lipoprotein receptor antagonists in vivo. *Circ. Res.*, 2009; 104: 750–757.
- [220] Liu SX, Hou FF, Guo ZJ, Nagai R, Zhang WR, Liu ZQ, Zhou ZM, Zhou M, Xie D, Wang GB, Zhang X. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 2006; 26(5): 1156-1162.
- [221] Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Gausson V, Mothu N, London GM, Jungers P. Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.*, 2005; 45(1): 39-47.
- [222] Drüeke T, Witko-Sarsat V, Massy Z, Descamps-Latscha B, Guerin AP, Marchais SJ, Gausson V, London GM. Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. *Circulation.*, 2002; 106(17): 2212-7
- [223] Shishehbor MH, Aviles RJ, Brennan ML, Fu X, Goormastic M, Pearce GL, Gokce N, Keaney JF Jr, Penn MS, Sprecher DL, Vita JA, Hazen SL. Association of nitrotyrosine

- levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA.*, 2003; 289(13): 1675-1680.
- [224] Gómez-Fernández P, Pérez-Requena J, Sánchez-Margalet V, Esteban J, Murillo-Carretero M, Almaraz-Jiménez M. Vascular damage in chronic renal failure. The increase of vascular nitrotyrosine and cytokines accumulation is accompanied by an increase of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression. *Nefrologia.*, 2005; 25(2): 155-162.
- [225] Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Schirmacher P, Müller A, Meyer HP, Gross ML. Arterial calcification in patients with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2009; 24(8): 2488-2496.
- [226] Martens RJH, Broers NJH, Canaud B, Christiaans MHL, Cornelis T, Gauly A, Hermans MMH, Konings CJAM, van der Sande FM, Scheijen JLJM, Stiff F, Wirtz JJJM, Kooman JP, Schalkwijk CG. Relations of advanced glycation endproducts and dicarbonyls with endothelial dysfunction and low-grade inflammation in individuals with end-stage renal disease in the transition to renal replacement therapy: A cross-sectional observational study. *PLoS One.*, 2019; 14(8): e0221058.
- [227] Sobal G, Menzel J, Sinzinger H. Why is glycated LDL more sensitive to oxidation than native LDL? A comparative study. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.*, 2000; 63(4): 177-186.
- [228] Selvin E, Halushka MK, Rawlings AM, Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Coresh J, Astor BC. sRAGE and risk of diabetes, cardiovascular disease, and death. *Diabetes.*, 2013; 62(6): 2116-2221.
- [229] Lindsey JB, de Lemos JA, Cipollone F, Ayers CR, Rohatgi A, Morrow DA, Khera A, McGuire DK. Association between circulating soluble receptor for advanced glycation end products and atherosclerosis: observations from the Dallas Heart Study. *Diabetes Care.*, 2009; 32(7): 1218-1220.
- [230] Sakaguchi T, Yan SF, Yan SD, Belov D, Rong LL, Sousa M, Andrassy M, Marso SP, Duda S, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth PP, Stern DM, Schmidt AM, Naka Y. Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *J. Clin. Invest.*, 2003; 111(7): 959-972.
- [231] Zhou Z, Wang K, Penn MS, Marso SP, Lauer MA, Forudi F, Zhou X, Qu W, Lu Y, Stern DM, Schmidt AM, Lincoff AM, Topol EJ. Receptor for AGE (RAGE) mediates neointimal formation in response to arterial injury. *Circulation.* 2003; 107(17): 2238-2243.

- [232] Koyama H, Nishizawa Y. AGEs/RAGE in CKD: irreversible metabolic memory road toward CVD? *Eur. J. Clin. Invest.*, 2010; 40(7): 623-35.
- [233] Tang SC, Wang YC, Li YI, Lin HC, Manzanero S, Hsieh YH, Phipps S, Hu CJ, Chiou HY, Huang YS, Yang WS, Mattson MP, Arumugam TV, Jeng JS. Functional role of soluble receptor for advanced glycation end products in stroke. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2013; 33(3): 585-594.
- [234] Wang X, Xu T, Mungun D, et al. The Relationship between Plasma Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products and Coronary Artery Disease. *Dis. Markers.*, 2019; 2019: 4528382.
- [235] Kim HS, Chung W, Kim AJ, Ro H, Chang JH, Lee HH, Jung JY. Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end product are inversely associated with vascular calcification in patients on haemodialysis independent of S100A12 (EN-RAGE) levels. *Nephrology (Carlton).*, 2013; 18(12): 777-782.
- [236] Canaff L, Hendy GN. Human calcium-sensing receptor gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277(33): 30337-30350.
- [237] Feinfeld DA, Sherwood LM. Parathyroid hormone and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in chronic renal failure. *Kidney International.*, 1988; 33(6): 1049-1058
- [238] Jaqueto M, Delfino VD1, Bortolasci CC, Barbosa DS, Morimoto HK, Frange RF, Ferreira LF, Guimarães FB. Are PTH levels related to oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease patients on hemodialysis? *J. Bras. Nefrol.*, 2016; 38(3): 288-295.
- [239] Noyan T, Avci G, Sekeroglu MR, Erkoç R. The investigation of relationship between secondary hyperparathyroidism and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *Turk. Neph. Dial. Transpl. J.*, 2009; 18:69-75.
- [240] Nakatani S, Yasukawa K, Ishimura E, et al. Non-mercaptalbumin, Oxidized Form of Serum Albumin, Significantly Associated with Renal Function and Anemia in Chronic Kidney Disease Patients. *Sci. Rep.*, 2018; 8(1): 16796.
- [241] Gambardella J, De Rosa M, Sorriento D, et al. Parathyroid Hormone Causes Endothelial Dysfunction by Inducing Mitochondrial ROS and Specific Oxidative Signal Transduction Modifications. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2018; 2018: 9582319.
- [242] Lin L, Zhao GJ, Qin LL. Association between advanced oxidation protein products (AOPP) and vascular calcification in uremic patients. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2017; 21(18): 4147-4152.

- [243] Guilgen G, Werneck ML, de Noronha L, Martins AP, Varela AM, Nakao LS, Pecoits-Filho R. Increased calcification and protein nitration in arteries of chronic kidney disease patients. *Blood Purif.*, 2011; 32(4): 296-302.
- [244] Kendrick J, Chonchol M. The role of phosphorus in the development and progression of vascular calcification. *Am. J. Kidney Dis.*, 2011; 58(5): 826-834.
- [245] Schlieper G, Schurgers L, Brandenburg V, Reutelingsperger C, Floege J. Vascular calcification in chronic kidney disease: an update. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2016; 31(1): 31-39.
- [246] Sage AP, Lu J, Tintut Y, Demer LL. Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int.*, 2011; 79: 414–422.
- [247] Brandenburg VM, Kramann R, Rothe H, Kaesler N, Korbiel J, Specht P, Schmitz S, Krüger T, Floege J, Ketteler M. Calcific uremic arteriolopathy (calciphylaxis): data from a large nationwide registry. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2017; 32(1): 126-132.
- [248] Nigwekar SU, Kroshinsky D, Nazarian RM, et al. Calciphylaxis: risk factors, diagnosis, and treatment. *Am. J. Kidney Dis.*, 2015; 66(1): 133–146.
- [249] Santos PW, He J, Tuffaha A, Wetmore JB. Clinical characteristics and risk factors associated with mortality in calcific uremic arteriolopathy. *Int. Urol. Nephrol.*, 2017; 49(12): 2247-2256.
- [250] Purnomo E, Emoto N, Nugrahaningsih DA, Nakayama K, Yagi K, Heiden S, Nadanaka S, Kitagawa H, Hirata K. Glycosaminoglycan overproduction in the aorta increases aortic calcification in murine chronic kidney disease. *J. Am. Heart Assoc.*, 2013; 2(5): e000405.
- [251] Nyitrai M, Balla G, Balla J. Oxidative stress: one of the major causes of vascular calcification in chronic kidney disease patients. *Orv. Hetil.*, 2015; 156(47): 1926-1931.
- [252] Sowers KM, Hayden MR. Calcific uremic arteriolopathy: pathophysiology, reactive oxygen species and therapeutic approaches. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2010; 3(2): 109-121.
- [253] Udomkarnjananun S, Kongnatthasate K, Praditpornsilpa K, Eiam-Ong S, Jaber BL, Susantitaphong P. Treatment of Calciphylaxis in CKD: A Systematic Review and Meta-analysis. *Kidney Int. Rep.*, 2018; 4(2): 231–244.
- [254] Taki K, Takayama F, Tsuruta Y, Niwa T. Oxidative stress, advanced glycation end product, and coronary artery calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int.*, 2006; 70(1): 218-224.

- [255] Kitauchi T, Yoshida K, Yoneda T, Saka T, Yoshikawa M, Ozono S, Hirao Y. Association between pentosidine and arteriosclerosis in patients receiving hemodialysis. *Clin. Exp. Nephrol.*, 2004; 8(1): 48-53.
- [256] Karsli Ceppioğlu S, Yurdun T, Canbakan M. Assessment of matrix Gla protein, Klotho gene polymorphisms, and oxidative stress in chronic kidney disease. *Ren. Fail.*, 2011; 33(9): 866-874.
- [257] Roumeliotis S, Dounousi E, Eleftheriadis T, Liakopoulos V. Association of the Inactive Circulating Matrix Gla Protein with Vitamin K Intake, Calcification, Mortality, and Cardiovascular Disease: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019; 20(3) :628.
- [268] Kuro-o M. Klotho and aging. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 1049-1058.
- [269] Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, Fujimori T, Nabeshima Y. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett.*, 2004; 565: 143–147.
- [270] Wolf MT, An SW, Nie M, Bal MS, Huang CL. Klotho up-regulates renal calcium channel transient receptor potential vanilloid 5 (TRPV5) by intra- and extracellular N-glycosylation-dependent mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 2014; 289(52): 35849-35857.
- [271] Jüppner H. Phosphate and FGF-23. *Kidney Int. Suppl.*, 2011; 121: S24-27
- [272] Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280(45): 38029-38034.
- [273] Dalton GD, Xie J, An SW, Huang CL. New Insights into the Mechanism of Action of Soluble Klotho. *Front. Endocrinol. (Lausanne).*, 2017; 8: 323.
- [274] Wang Q, Su W, Shen Z, Wang R. Correlation between Soluble  $\alpha$ -Klotho and Renal Function in Patients with Chronic Kidney Disease: A Review and Meta-Analysis. *Biomed. Res. Int.*, 2018; 2018: 9481475.
- [275] Liu QF, Yu LX, Feng JH, Sun Q, Li SS, Ye JM. The Prognostic Role of Klotho in Patients with Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Dis. Markers.* 2019; 2019: 6468729.
- [276] Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280(45): 38029-38034.
- [277] Raeisi S, Ghorbanhaghjo A1, Argani H, Dastmalchi S, Ghasemi B, Ghazizadeh T, Rashtchizadeh N, Nemati M, Mesgari Abbasi M, Bargahi N, Mota A, Vatankhah AM.

- Effects of Angiotensin II Receptor Blockade on Soluble Klotho and Oxidative Stress in Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity in Rats. *Iran J. Kidney Dis.*, 2016; 10(6): 358-363.
- [278] Oh HJ, Nam BY, Lee MJ, Kim CH, Koo HM, Doh FM, Han JH, Kim EJ, Han JS, Park JT, Yoo TH, Kang SW, Han DS, Han SH. Decreased circulating klotho levels in patients undergoing dialysis and relationship to oxidative stress and inflammation. *Perit. Dial. Int.*, 2015; 35(1): 43-51.
- [279] Duni A, Liakopoulos V, Roumeliotis S, Peschos D, Dounousi E. Oxidative Stress in the Pathogenesis and Evolution of Chronic Kidney Disease: Untangling Ariadne's Thread. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019; 20(15): E3711.
- [280] Zhou L, Chen X, Lu M, Wu Q, Yuan Q, Hu C, Miao J, Zhang Y, Li H, Hou FF, Nie J, Liu Y. Wnt/ $\beta$ -catenin links oxidative stress to podocyte injury and proteinuria. *Kidney Int.*, 2019; 95(4): 830-845.
- [281] Kimura T, Shiizaki K, Akimoto T, Shinzato T, Shimizu T, Kurosawa A, Kubo T, Nanmoku K, Kuro-O M, Yagisawa T. The impact of preserved Klotho gene expression on antioxidative stress activity in healthy kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2018; 315(2): F345-F352.
- [282] Zhao Y, Banerjee S, Dey N, LeJeune WS, Sarkar PS, Brobey R, Rosenblatt KP, Tilton RG, Choudhary S. Klotho depletion contributes to increased inflammation in kidney of the db/db mouse model of diabetes via RelA (serine)536 phosphorylation. *Diabetes.*, 2011; 60(7): 1907-1916.
- [283] Sung JY, Chung W, Kim AJ, Kim HS, Ro H, Chang JH, Lee HH, Jung JY. Calcitriol treatment increases serum levels of the soluble receptor of advanced glycation end products in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2013; 230(1): 59-66.
- [284] Galichet A, Weibel M, Heizmann CW. Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 370(1): 1-5.
- [285] Mimić-Oka J, Savić-Radojević A, Pljesa-Ercegovac M, Opacić M, Simić T, Dimković N, Simić DV. Evaluation of oxidative stress after repeated intravenous iron supplementation. *Ren. Fail.*, 2005; 27(3): 345-351.
- [286] Anraku M, Kitamura K, Shinohara A, Adachi M, Suenga A, Maruyama T, Miyanaka K, Miyoshi T, Shiraishi N, Nonoguchi H, Otagiri M, Tomita K. Intravenous iron administration induces oxidation of serum albumin in hemodialysis patients. *Kidney Int.*, 2004; 66(2): 841-848.



- [287] Ganz T, Nemeth E. Iron Balance and the Role of Hepcidin in Chronic Kidney Disease. *Semin. Nephrol.*, 2016; 36(2): 87-93.
- [288] Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Invest.*, 2004;113(9): 1271-1276.
- [289] Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2002;110(7): 1037-1044.
- [290] Maruyama Y, Yokoyama K, Yamamoto H, Nakayama M, Hosoya T. Do serum hepcidin-25 levels correlate with oxidative stress in patients with chronic kidney disease not receiving dialysis? *Clin. Nephrol.*, 2012;78(4): 281-286.
- [291] Liakopoulos V, Roumeliotis S, Gorny X, Dounousi E, Mertens PR. Oxidative Stress in Hemodialysis Patients: A Review of the Literature. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2017; 2017: 3081856.
- [292] An SH, Lee MS, Kang JH. Oxidative modification of ferritin induced by methylglyoxal. *BMB Rep.*, 2012; 45(3): 147-152.
- [293] Antolini F, Valente F, Ricciardi D, Fagugli RM. Normalization of oxidative stress parameters after kidney transplant is secondary to full recovery of renal function. *Clin. Nephrol.*, 2004; 62(2): 131-137.
- [294] Ito K, Sakata N, Nagai R, Shirakawa JI, Watanabe M, Mimata A, Abe Y, Yasuno T4, Sasatomi Y, Miyake K, Ueki N, Hamauchi A, Nakashima H. High serum level of methylglyoxal-derived AGE, N $\delta$ -(5-hydroxy-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine, independently relates to renal dysfunction. *Clin. Exp. Nephrol.*, 2017; 21(3): 398-406.
- [295] Mazzali M, Hughes J, Kim YG, Jefferson JA, Kang DH, Gordon KL, Lan HY, Kivlighn S, Johnson RJ. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension.*, 2001; 38(5): 1101-1106.
- [296] Madero M, Sarnak MJ, Wang X, Greene T, Beck GJ, Kusek JW, Collins AJ, Levey AS, Menon V. Uric acid and long-term outcomes in CKD. *Am. J. Kidney Dis.*, 2009; 53(5): 796-803.
- [297] Roumeliotis S, Roumeliotis A, Dounousi E, Eleftheriadis T, Liakopoulos V. Dietary Antioxidant Supplements and Uric Acid in Chronic Kidney Disease: A Review. *Nutrients.*, 2019; 11(8): e1911

- [298] Maruhashi T, Hisatome I, Kihara Y, Higashi Y. Hyperuricemia and endothelial function: From molecular background to clinical perspectives. *Atherosclerosis.*, 2018; 278: 226-231.
- [299] Hink HU, Fukai T. Extracellular superoxide dismutase, uric acid, and atherosclerosis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 2002; 67: 483-490.
- [300] Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J.* 1986; 235(3): 747-754.

## 8. STRESZCZENIE

Stres oksydacyjny definiowany jest jako zaburzenie równowagi między procesami, w których dochodzi do wytwarzania RFT a procesami antyoksydacyjnymi, w wyniku czego obserwuje się w ustroju skutki patologicznej aktywności RFT. Wzmocniona produkcja RFT prowadzi do przesunięcia równowagi redox w stronę utleniania, co niesie za sobą poważne skutki dla całego ustroju. Oksydacyjne modyfikacje białek związane są z patomechanizmem wielu chorób, wśród których znajduje się również przewlekła choroba nerek.

W wyniku działania RFT dochodzi do peroksydacji lipidów oraz utleniania białek, węglowodanów i kwasów nukleinowych. Oksydacyjna modyfikacja białek obejmuje szerokie spektrum zmian takich jak tworzenie wiązań dityrozynowych i mostków disiarczkowych oraz zwiększenie liczby grup karbonylowych, co prowadzi do tworzenia AOPPs. Atak RFA na białka skutkuje do S-nitrozylacją i nitracją reszt aminokwasowych, z tworzeniem 3-nitrotyrozyny. Karbamyłacja również zaliczana jest do potranslacyjnych modyfikacji białkowych związanych ze stresem oksydacyjnym. Z kolei stres karbonyłowy powiązany jest zaburzeniami równowagi redox i modyfikacjami białek, gdyż reakcje glikacji i lipooksydacji doprowadzają do wzmożonej syntezy reaktywnych związków karbonylowych, które modyfikują cząsteczki białek z tworzeniem AGEs.

Modyfikacje białek w warunkach stresu oksydacyjnego skutkują zmianą struktury cząsteczki, utratą aktywności enzymatycznej oraz zdolności do rozpoznawania i łączenia się z ligandem. W efekcie w komórce dochodzi do zakłócenia szlaków sygnałowych, nieprawidłowego działania enzymów, białek regulatorowych i czynników transkrypcyjnych, co może doprowadzić do śmierci komórki. Modyfikacja białek macierzy pozakomórkowej i białek osocza zmienia ich właściwości fizykochemiczne, co prowadzi do uszkodzenia narządów, zaburzeń metabolicznych i nieprawidłowości gospodarki wodno-elektrolitowej. W ten sposób stres oksydacyjny i powiązane z nim procesy stresu karbonyłowego oraz karbamyłacji i glikacji doprowadzają – poprzez modyfikację białek – do zaburzeń ogólnoustrojowej homeostazy.

W rozprawie rozpatrywano problem wpływu zaawansowania przewlekłej choroby nerek na kumulację wykładników modyfikacji białek. W przypadku chorych w schyłkowej niewydolności nerek ocenie podlegał też wpływ metody leczenia nerkozastępczego. Modyfikacje białek związane ze stresem oksydacyjnym wpisują się w szereg powikłań przewlekłej choroby nerek takich, jak niedożywienie, przewlekły stan zapalny, dyslipidemia, zaburzenia gospodarki żelazowej i zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej. Pacjenci z

przewlekłą chorobą nerek cechują się też znacznie częstszym występowaniem chorób o etiologii miażdżycowej, niż osoby o prawidłowej funkcji nerek. Z tego względu w obecnej pracy szczególnej ocenie poddano wpływ oksydacyjnych modyfikacji białek na powikłania przewlekłej choroby nerek w aspekcie uszkodzenia układu sercowo-naczyniowego. Ocenie odrębności rozwoju zmian miażdżycowych u chorych z przewlekłą chorobą nerek służyło porównanie grup nefrologicznych z grupą chorych z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie przy prawidłowej funkcji nerek.

Analiza statystyczna wyników wykazała, że chorzy w stadium G3b-G4 przewlekłej choroby nerek charakteryzowali się mniejszą kumulacją wykładników modyfikacji białek, niż chorzy w schyłkowej niewydolności nerek, co sugeruje narastanie stresu oksydacyjnego wraz z postępem przewlekłej choroby nerek. Z kolei pacjenci hemodializowani cechowali się wyższymi stężeniami większości wykładników modyfikacji białek, niż pacjenci dializowani otrzewnowo, co skłania do uznania hemodializy za metodę leczenia nerkozastępczego cechującą się większym nasileniem stresu oksydacyjnego.

W ocenie zależności pomiędzy stężeniami wykładników oksydacyjnych modyfikacji białek w poszczególnych grupach a stężeniami kolejnych parametrów laboratoryjnych stwierdzono, że u pacjentów dializowanych otrzewnowo związek pomiędzy stresem oksydacyjnym a miażdżycą wynikał głównie z niedożywienia oraz dyslipidemii, podczas gdy u pacjentów w programie hemodializ stres oksydacyjny powiązany był głównie z wtórną nadczynnością przytarczyc oraz z zaburzeniami gospodarki żelazowej. Chorzy z przewlekłą chorobą nerek cechowali się większą kumulacją wykładników oksydacyjnych modyfikacji białek, niż pacjenci z co najmniej jednym epizodem sercowo-naczyniowym w wywiadzie i prawidłową funkcją nerek, a różnica ta była silniej wyrażona w przypadku chorych w schyłkowej niewydolności nerek, niż u chorych we wcześniejszych stadiach przewlekłej choroby nerek. Potwierdziło to hipotezę o kluczowym znaczeniu stresu oksydacyjnego jako nieklasycznego czynnika ryzyka sercowo-naczyniowego w przebiegu przewlekłej choroby nerek.

## 9. SUMMARY

Oxidative stress is defined as an imbalance between antioxidant processes and the processes responsible for reactive oxygen species (ROS) production. During this stress the increased ROS production outweighs the antioxidant processes shifting the redox balance towards oxidation, what has serious consequences for the entire human body. Chronic kidney disease is one of diseases and disorders caused by pathomechanisms associated with the oxidative stress.

The effects of ROS activity include lipid peroxidation and oxidation of proteins, carbohydrates and nucleic acids. Oxidative modification of proteins covers a wide spectrum of changes, such as the formation of dityrosine bonds and disulfide bridges, as well as an increase in the number of carbonyl groups, which together leads to the formation of AOPP. Nitrogen stress is also associated with oxidative stress and the attack of reactive nitrogen species on proteins causes S-nitrosylation and nitration of amino acids residues, including the formation of 3-nitrotyrosine. The post-translational protein modifications associated with oxidative stress also include carbamylation. The carbonyl stress is associated with redox imbalances and oxidative modification of proteins. Glycation and lipoxidation reactions lead to the increased synthesis of reactive carbonyl compounds that modify proteins with AEGs.

The oxidative modifications of proteins lead to a disturbance of the protein molecule structure, loss of the protein enzymatic activity and its ability to recognize and bind ligand. As a result, the signal pathways in the cell are disturbed and errors occur in the action of enzymes, regulatory proteins and transcription factors, which can lead to cell death. Modification of extracellular matrix proteins and plasma proteins changes their physicochemical properties, which leads to organ damage, metabolic disorders and water-electrolyte imbalance. In this way, oxidative stress and related processes of nitrogen and carbonyl stress as well as carbamylation lead – by protein modifications – to disorders of systemic homeostasis.

The studies included the effect of the chronic kidney disease advancement on the accumulation of oxidative stress markers in plasma. In the patients with end-stage renal disease, the effect of replacement therapy was also assessed. Therefore, the patients with chronic kidney disease were evaluated divided into three groups (chronic kidney disease at stage G3b-G4, peritoneal dialysis, hemodialysis). In addition, changes in the interrelationship between oxidative modifications, carbonyl and nitrogen stress, and the carbamylation

resulting from the progression of kidney disease have been taken into account. This issue is related to assessment whether the protein modification types differentiate patients depending on the stage of chronic kidney disease and the method of renal replacement therapy. Protein modifications associated with oxidative stress are a part of the complications resulting from chronic kidney disease, such as malnutrition, chronic inflammation, dislipemia, iron disorder, and calcium and phosphate disorders. Also diseases of atherosclerosis etiology are much higher frequent in patients with chronic kidney disease than in those with normal kidney function. Therefore, in the studies presented here, particular attention was paid to the effect of oxidative stress on chronic kidney disease complications in the aspect of cardiovascular damage. The specificity of atherosclerosis in patients with chronic kidney disease was evaluated by comparing groups of this type of patients with patients with ischemic heart diseases and normal renal function.

Statistical analysis of the results showed that patients in the G3b-G4 stage of chronic kidney disease were characterized by lower accumulation of oxidative stress markers than patients in end-stage renal disease, suggesting an increase in oxidative stress with the progression of chronic kidney disease. On the other hand, hemodialysis patients were characterized by higher concentration of most of the oxidative stress markers than peritoneal dialysis patients, which prompts hemodialysis to be recognized as a method of renal replacement therapy characterized by increased oxidative stress.

Analyzing the relations between the concentration of oxidative stress markers and the individual groups of respondents, it was found that in peritoneal dialysis patients the relationship between oxidative stress and atherosclerosis was mainly due to malnutrition and dislipemia, while in hemodialysis patients the oxidative stress was mainly associated with secondary hyperparathyroidism and iron disorders. In addition, Klotho protein has been found to be important for protection of the body against the increasing concentration of MG, AOPPs and 3-nitrotyrosine in patients with end-stage renal disease. In contrast, the uric acid concentration increased in the end-stage of renal disease, along with increasing concentration of CML and AGEs, which confirms the significant role of this compound as leading antioxidants in plasma.

Greater accumulation of markers for oxidative stress markers was characteristic for patients with chronic kidney disease than for patients with ischemic heart disease and normal renal function. This difference was more pronounced in end-stage renal disease than in earlier stages of chronic kidney disease. The results confirmed the hypothesis about the key

importance of oxidative stress as a non-classical cardiovascular risk factor in chronic kidney disease.

## **10. SPIS RYCIN I TABEL**

### **10.1. SPIS RYCIN**

Ryc.1. Stres oksydacyjny jako stan braku równowagi pomiędzy wytwarzaniem RFT a procesami antyoksydacyjnymi. Opracowanie własne.....	11
Ryc. 2. Przewlekły stan zapalny i stres oksydacyjny w PChN. Opracowano na podstawie [20, 22].....	13
Ryc. 3. Znaczenie metody leczenia nerkozastępczego w powstawaniu stresu oksydacyjnego. Opracowanie własne.....	16
Ryc. 4. Oksydacyjne modyfikacje białek. Opracowanie własne.....	17
Ryc. 5. Powstawanie zaawansowanych produktów utleniania białek (AOPPs). Opracowanie własne.....	19
Ryc. 6. Wzory strukturalne związków dikarbonylowych. Opracowano na podstawie [172].....	22
Ryc. 7. Wzory strukturalne zaawansowanych produktów glikacji (AGEs). Opracowano na podstawie [172]. .....	22
Ryc. 8. Powstawanie zaawansowanych produktów glikacji (AGEs). Opracowanie własne.....	23
Ryc. 9. Schemat zależności pomiędzy stresem karbonylowym a stresem oksydacyjnym. Opracowanie własne.....	26
Ryc. 10. Schemat powstawania sRAGE. Opracowano na podstawie [210].....	28
Ryc. 11. Wzór strukturalny 3-nitrotyrozyny. Opracowano na podstawie [241].....	31
Ryc. 12. Powstawanie 3-nitrotyrozyny. Opracowanie własne.....	32

Ryc. 13. Budowa strukturalna białek karbamylowanych. Opracowano na podstawie [221].....	34
Ryc. 14. Powstawanie białek karbamylowanych. Opracowanie własne.....	35
Ryc. 15. Schemat podziału grupy osób zakwalifikowanych do badania.....	40
Ryc. 16. Porównanie stężenia AOPPs dla 5 grup badanych.....	53
Ryc. 17. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu AOPPs. ....	53
Ryc. 18. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu AOPPs, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami.....	54
Ryc. 19. Zależność pomiędzy stężeniem AOPPs a stężeniem HDL-cholesterolu w grupie DO.....	55
Ryc. 20. Zależność pomiędzy stężeniem AOPPs a stężeniem PTH w grupie HD.....	55
Ryc. 21. Zależność pomiędzy stężeniem AOPPs a stężeniem białka Klotho w grupie HD.....	56
Ryc. 22. Porównanie stężenia MG dla 5 grup badanych.....	58
Ryc. 23. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu MG.....	58
Ryc. 24. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu MG, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami.....	59
Ryc. 25. Zależność pomiędzy stężeniem MG a stężeniem glukozy w grupie DO.....	60
Ryc. 26. Zależność pomiędzy stężeniem MG a stężeniem białka Klotho w grupie DO.....	60
Ryc. 27. Zależność pomiędzy stężeniem MG a wartością TIBC w grupie HD.....	61
Ryc. 28. Zależność pomiędzy stężeniem MG a wartością UIBC w grupie HD.....	61



Ryc. 29. Zależność pomiędzy stężeniem MG a stężeniem ferrytyny w grupie HD.....	62
Ryc. 30. Porównanie stężenia CEL dla 5 grup badanych.....	63
Ryc. 31. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu CEL.....	64
Ryc. 32. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu CEL, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami.....	64
Ryc. 33. Zależność pomiędzy stężeniem CEL a wartością WBC w grupie PRE.....	65
Ryc. 34. Zależność pomiędzy stężeniem CEL a stężeniem LDL-cholesterolu w grupie HD.....	66
Ryc. 35. Zależność pomiędzy stężeniem CEL a stężeniem HDL-cholesterolu w grupie HD.....	66
Ryc. 36. Porównanie stężenia CML dla 5 grup badanych.....	68
Ryc. 37. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu CML.....	68
Ryc. 38. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu CML, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami.....	69
Ryc. 39. Zależność pomiędzy stężeniem CML a wartością UIBC w grupie DO.....	70
Ryc. 40. Zależność pomiędzy stężeniem CML a stężeniem żelaza w grupie HD.....	71
Ryc. 41. Porównanie stężenia AGEs dla 5 grup badanych.....	72
Ryc. 42. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu AGEs.....	73
Ryc. 43. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu AGEs, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami.....	73

Ryc. 44. Zależność pomiędzy stężeniem AGEs a wartością WBC w grupie HD.....	74
Ryc. 45. Zależność pomiędzy stężeniem AGEs a wartością WBC w grupie HD.....	75
Ryc. 46. Zależność pomiędzy stężeniem AGEs a stężeniem kwasu moczowego w grupie HD.....	75
Ryc. 47. Porównanie stężenia grup karbonylowych białek dla 5 grup badanych.....	77
Ryc. 48. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu grup karbonylowych białek.....	77
Ryc. 49. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu grup karbonylowych białek, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami.....	78
Ryc. 50. Zależność pomiędzy stężeniem grup karbonylowych białek a stężeniem żelaza w grupie HD.....	79
Ryc. 51. Porównanie stężenia sRAGE dla 5 grup badanych.....	80
Ryc. 52. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu sRAGE.....	81
Ryc. 53. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu sRAGE, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami.....	81
Ryc.54. Zależność pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem kreatyniny w grupie PRE.....	83
Ryc. 55. Zależność pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem białka całkowitego w grupie DO.....	83
Ryc. 56. Zależność pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem albuminy w grupie DO.....	84
Ryc. 57. Zależność pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem cholesterolu całkowitego w grupie DO.....	84
Ryc. 58. Zależność pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem białka całkowitego w grupie HD.....	85

Ryc. 59. Zależność pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem albuminy w grupie HD.....	85
Ryc. 60. Zależność pomiędzy stężeniem sRAGE a stężeniem mocznika w grupie HD.....	86
Ryc. 61. Porównanie stężenia 3-nitrotyrozyny dla 5 grup badanych.....	87
Ryc. 62. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu 3-nitrotyrozyny.....	88
Ryc. 63. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu 3-nitrotyrozyny, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami.....	88
Ryc. 64. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem kreatyniny w grupie PRE.....	90
Ryc. 65. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem białka całkowitego w grupie PRE.....	90
Ryc. 66. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem albuminy w grupie PRE.....	91
Ryc. 67. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem białka całkowitego w grupie DO.....	91
Ryc. 68. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem albuminy w grupie DO.....	92
Ryc. 69. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem fosforanów w grupie DO.....	92
Ryc. 70. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem LDL-cholesterolu w grupie DO.....	93
Ryc. 71. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem PTH w grupie DO.....	93
Ryc. 72. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem PTH w grupie HD.....	94
Ryc. 73. Zależność pomiędzy stężeniem 3-nitrotyrozyny a stężeniem białka Klotho w grupie HD.....	94
Ryc. 74. Porównanie stężenia grup karbamylowych białek dla 5 grup badanych.....	96
Ryc. 75. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu grup karbamylowych białek.....	96

Ryc. 76. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu grup karbamylowych białek, uwzględniające porównanie każdej z grup ze wszystkimi pozostałymi grupami.....	97
Ryc. 77. Zależność pomiędzy stężeniem grup karbamylowych białek a stężeniem kreatyniny w grupie PRE.....	98
Ryc. 78. Zależność pomiędzy stężeniem grup karbamylowych białek a stężeniem mocznika w grupie PRE.....	99
Ryc. 79. Zależność pomiędzy stężeniem grup karbamylowych białek a stężeniem cholesterolu całkowitego w grupie DO.....	99
Ryc. 80. Zależność pomiędzy stężeniem grup karbamylowych białek a wartością UIBC w grupie DO.....	100

## 10.2 SPIS TABEL

Tabela 1. Charakterystyka grupy badanych pod względem danych demograficznych.....	43
Tabela 2. Charakterystyka grup pod względem oceny parametrów laboratoryjnych.....	48
Tabela 3. Stężenia ocenianych modyfikacji białkowych w badanej grupie, z uwzględnieniem podziału na pięć głównych grup.....	51
Tabela 4. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu AOPPs.....	54
Tabela 5. Wyniki testu korelacji dla AOPPs i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności te okazały się być statystycznie istotne.....	56
Tabela 6. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu MG.....	59
Tabela 7. Wyniki testu korelacji dla MG i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne.....	62
Tabela 8. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu CEL.....	65
Tabela 9. Wyniki testu korelacji dla CEL i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne.....	67

Tabela 10. Wyniki testu korelacji dla CEL i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne.....	69
Tabela 11. Wyniki testu korelacji dla CML i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne.....	71
Tabela 12. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu AGEs.....	74
Tabela 13. Wyniki testu korelacji dla AGEs i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne.....	76
Tabela 14. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu grup karbonylowych białek.....	78
Tabela 15. Wyniki testu korelacji dla grup karbonylowych białek i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne. ....	79
Tabela 16. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu sRAGE.....	82
Tabela 17. Wyniki testu korelacji dla sRAGE i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne.....	86
Tabela 18. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu 3-nitrotyrozyny.....	89
Tabela 19. Wyniki testu korelacji dla 3-nitrotyrozyny i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne.....	95
Tabela 20. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu grup karbamylowych białek.....	97
Tabela 21. Wyniki testu korelacji dla grup karbamylowych białek i wybranych parametrów laboratoryjnych, dla których zależności były statystycznie istotne.....	100