

**COLLEGIUM MEDICUM
UNIWERSYTETU JAGIELLOŃSKIEGO
W KRAKOWIE**



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Monika Miklaszewska

**OCENA POWIERZCHNI BŁON DIALIZACYJNYCH TECHNIKĄ
MIKROSKOPU SIŁ ATOMOWYCH
I WPŁYWU REUTYLIZACJI NA ICH BIOZGODNOŚĆ ORAZ NA
KLIRENS WYBRANYCH TOKSYN MOCZNICOWYCH**

Praca doktorska

zrealizowana w ramach grantu promotorskiego KBN nr 3 T11E 023 27

Promotor: dr hab. n. med. Jacek A. Pietrzyk

Pracę wykonano:

w Zakładzie Dializ Katedry Pediatrii
Polsko – Amerykańskiego Instytutu Pediatrii
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
kierowanym przez dr hab. n. med. Jacka A. Pietrzyka

oraz

w Klinice Nefrologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
kierowanej przez prof. dr hab. n. med. Władysława Sułowicza

Kraków, 2005

Składam serdeczne podziękowania:

*Promotorowi - Dr hab. n. med. Jackowi A. Pietrzykowi,
Kierownikowi Zakładu Dializ Katedry Pediatrii
Polsko – Amerykańskiego Instytutu Pediatrii CM UJ;*

Zespołowi Kliniki Nefrologii CM UJ;

*Prof. dr hab. Krystynie Sztefko,
Kierownikowi Zakładu Biochemii Klinicznej
Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie;*

*Prof. dr hab. Markowi Szymońskiemu,
Kierownikowi Instytutu Fizyki UJ;*

oraz

*Zespołowi Katedry Elektroniki Akademii Górniczo – Hutniczej im. S. Staszica
w Krakowie, kierowanej przez Prof. dr hab. inż. Lidię Maksymowicz
w osobach:*

*mgr inż. Lidii Krawentek,
dr inż. Przemysława Korohody,
dr inż. Romana Rumiana*

za życzliwość i pomoc w realizacji niniejszej pracy.

WYKAZ SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY

Użyty skrót	Pełna nazwa	Objaśnienie skrótu
Å		1 angstrom = $1,0 \times 10^{-10}$ metra
AAMI	<i>Association for the Advancement of Medical Instrumentation</i>	Stowarzyszenie Postępów Techniki Medycznej (USA)
ACT	<i>activated clotting time</i>	aktywowany czas krzepnięcia
AGE	<i>advanced glycation end products</i>	produkty zaawansowanej glikacji białek
AFM	<i>atomic force microscopy</i>	mikroskop sił atomowych
β2M		β2 - mikroglobulina
BR	<i>bearing ratio</i>	proporcja pokrycia
CIS	<i>cytokine inducing substances</i>	substancje indukujące cytokiny
Da		dalton (masa cząsteczkowa)
ETO	<i>ethylene oxide</i>	tlenek etylenu
FBV	<i>fibre boundle volume</i>	objętość przedziału krwi kapilar
HD	<i>hemodialysis</i>	hemodializa
INOS	<i>inducible NO synthase</i>	indukowana syntaza NO
IRAK-1	<i>IL1-1R-associated kinase-1</i>	
IL		interleukina
JWZ%		jednopodstawowy wskaźnik zmian
K _D		klirens dializatora
KoA	<i>overall mass transfer coefficient</i>	współczynnik przepuszczalności masowej dializatora
Kufr		współczynnik ultrafiltracji dializatora
KUP	<i>cuprophane</i>	błona kuprofanowa, używany polski skrót błony kuprofanowej
LAL	<i>limulus amoeba lysate</i>	
LPS		lipopolisacharyd
Mal	<i>MyD88 adaptor like</i>	
MIA	<i>malnutrition inflammation atherosclerosis syndrome</i>	zespół niedożywienia, zapalenia, miażdżycy
MyD88	<i>myeloid differentiation protein 88</i>	
N		nowy dializator
NCS	<i>nanocontrolled spinning</i>	
NF κB	<i>nuclear factor kappa B</i>	czynnik jądrowy kappa B
nm		nanometr, $1,0 \times 10^{-9}$ metra
ONN		ostra niewydolność nerek
PA		przyrost absolutny
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>	filogenetycznie wzorce antygenowe tzw. „podpisy molekularne”
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>	komórki jednojądrzaste krwi obwodowej
PNN		przewlekła niewydolność nerek
PPV	<i>post priming volume</i>	objętość po płukaniu (dializatora)

PRR	<i>pattern recognition receptors</i>	receptory rozpoznające wzorce
PS	<i>polysulfone</i>	błona polisulfonowa
PVP		poliwinylopirolidon
Q _B		szybkość przepływu krwi
Q _D		szybkość przepływu dializatu
RMS	<i>root mean square</i>	odchyłka średniokwadratowa
RO	<i>reverse osmosis</i>	odwrócona osmoza
SARM	<i>SAM and ARM – containing protein</i>	
Sc	<i>sieving coefficient</i>	współczynnik przesiewalności
SEM	<i>scanning electron microscopy</i>	elektronowy mikroskop skaningowy
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>	zespół układowej odpowiedzi zapalnej
SNN		schyłkowa niewydolność nerek
SPM	<i>scanning probe microscopy</i>	mikroskop ze skanującą sondą
T%		tempo zmian
TEM	<i>transmission electron microscopy</i>	elektronowy mikroskop transmisyjny
TIR	<i>toll IL-1 receptor</i>	
TIRAP	<i>TIR adaptor protein</i>	
TLR	<i>toll like receptors</i>	receptory toll – podobne
TMP	<i>transmembrane pressure</i>	ciśnienie przez błonowe
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>	czynnik martwicy nowotworów
TRAF6	<i>TNFα receptor associated factor 6</i>	
TRAM	<i>Trif related adaptor molecule</i>	
Trif	<i>TIR domain containing adaptor inducing interferon β</i>	
V		objętość dystrybucji
V%		współczynnik zmienności

SPIS TREŚCI

1.	WSTĘP.....	9
1.1.	Przewlekła niewydolność nerek problemem medycyny XXI wieku.....	9
1.2.	Hemodializa - dominującą formą leczenia nerkozastępczego.....	9
1.3.	Wyniki leczenia chorych dializowanych.....	10
1.4.	Błona dializacyjna kluczem do skutecznej dializy.....	11
1.4.1.	Błony celulozowe.....	11
1.4.2.	Błony syntetyczne.....	13
1.5.	Możliwości badania powierzchni błon dializacyjnych.....	22
1.5.1.	Zasada działania mikroskopu sił atomowych.....	23
1.5.1.1.	Tryby pracy ostrza AFM.....	26
1.6.	Toksyny mocznicowe, klirens związków nisko- i średniocząsteczkowych.....	27
1.7.	Powody, dla których reutilizuje się dializatory.....	32
1.8.	Korzystne i niekorzystne aspekty reutilizacji.....	33
1.9.	Niebezpieczeństwa i pułapki reutilizacji.....	33
1.10.	Wprowadzenie do badań odpowiedzi interleukinowej w kontekście reutilizacji i badań AFM.....	34
1.11.	Podsumowanie.....	36
2.	CELE PRACY.....	38
3.	MATERIAŁ I METODY.....	39
3.1.	CZĘŚĆ KLINICZNA PRACY.....	39
3.1.1.	Charakterystyka pacjentów.....	39
3.1.2.	Dostęp naczyniowy.....	40
3.1.3.	Dializatory.....	40
3.1.3.1.	Kwalifikacja dializatora do reutilizacji.....	42
3.1.3.2.	Przygotowanie dializatora do ponownego użycia.....	42
3.1.4.	Antykoagulacja.....	42
3.1.5.	Zgoda Komisji Bioetycznej.....	43
3.2.	CZĘŚĆ POMIAROWA PRACY.....	44
3.2.1.	BADANIE NANOSTRUKTURY POWIERZCHNI BŁON DIALIZACYJNYCH.....	44
3.2.1.1.	Metodologia badań nanostruktury błon dializacyjnych.....	44
3.2.1.2.	Obrazowanie włókien kuprofanowych.....	45
3.2.1.3.	Obrazowanie włókien polisulfonowych.....	46
3.2.1.4.	Charakterystyka stosowanych ostrzy AFM.....	46
3.2.1.5.	Przetwarzanie i analiza obrazów z mikroskopu sił atomowych do badania powierzchni błon dializacyjnych.....	46
3.2.1.5.1.	Przetwarzanie wstępne.....	46
3.2.1.5.2.	Analizowane parametry szorstkości powierzchni.....	47
3.2.1.5.2.1.	Odchylenie RMS.....	47
3.2.1.5.2.2.	Amplituda w funkcji <i>bearing ratio</i>	48
3.2.1.5.2.3.	Współczynnik zmienności oraz wskaźniki dynamiki zmian.....	49

3.2.2.	OCENA WPŁYWU REUTYLIZACJI NA KLIRENS WYBRANYCH TOKSYN MOCZNICOWYCH.....	49
3.2.2.1.	Pomiar klirensu rzeczywistego dializatora.....	49
3.2.2.2.	Oznaczenia laboratoryjne markerów toksemii mocznicowej.....	51
3.2.2.2.1.	Oznaczenia stężenia mocznika, kreatyniny oraz kwasu moczowego.....	51
3.2.2.2.2.	Oznaczenia stężenia kwasu foliowego i witaminy B ₁₂	52
3.2.3.	METODOLOGIA OCENY BIOZGODNOŚCI BADANYCH BŁON DIALIZACYJNYCH.....	52
3.2.3.1.	Oznaczenia laboratoryjne markerów biozgodności	53
3.3.	ANALIZA STATYSTYCZNA – OPRACOWANIE UZYSKANYCH WYNIKÓW.....	54
3.3.1.	Analiza statystyczna wyników pomiarów szorstkości powierzchni błon dializacyjnych.....	54
3.3.2.	Analiza statystyczna wyników klirensów rzeczywistych dializatora.....	54
3.3.3.	Analiza statystyczna wyników oceny biozgodności błon dializacyjnych.....	54
4.	WYNIKI.....	56
4.1.	WYNIKI POMIARÓW SZORSTKOŚCI POWIERZCHNI BŁON DIALIZACYJNYCH.....	56
4.1.1.	Obrazy AFM powierzchni błon kuprofanowych i polisulfonowych.....	56
4.1.1.1.	Obrazy AFM powierzchni wewnętrznych błon kuprofanowych – po redukcji tła.....	56
4.1.1.2.	Obrazy AFM powierzchni wewnętrznych błon polisulfonowych – po redukcji tła.....	57
4.1.1.3.	Obrazy AFM powierzchni zewnętrznych błon kuprofanowych – po redukcji tła.....	58
4.1.1.4.	Obrazy AFM powierzchni zewnętrznych błon polisulfonowych – po redukcji tła.....	59
4.1.2.	Parametry szorstkości powierzchni: RMS, BR 20%, BR 80% oraz współczynnik zmienności (V%).....	60
4.1.3.	Graficzne przedstawienie wyników badania nanostruktury powierzchni błon dializacyjnych techniką AFM.....	62
4.1.3.1.	Parametry szorstkości: RMS, BR 20%, BR 80%.....	62
4.1.3.2.	Współczynnik zmienności (V%).....	64
4.1.3.3.	Wskaźniki dynamiki zmian.....	66
4.1.3.3.1.	Przyrost absolutny (PA) dla RMS powierzchni wewnętrznych błon kuprofanowych i polisulfonowych.....	66
4.1.3.3.2.	Tempo zmian (T%) dla RMS powierzchni wewnętrznych i zewnętrznych błon kuprofanowych i polisulfonowych.....	67
4.1.3.3.3.	Jednopodstawowy wskaźnik zmian (JWZ%) dla RMS powierzchni wewnętrznych i zewnętrznych błon kuprofanowych i polisulfonowych.....	68

4.2.	WYNIKI POMIARÓW KLIRENSÓW RZECZYWISTYCH DIALIZATORA.....	69
4.2.1.	Wartości klirensu rzeczywistego (K_D) i współczynnika przepuszczalności masowej (KoA) dla markerów niskocząsteczkowych: mocznika, kreatyniny i kwasu moczowego.....	69
4.2.1.1.	Dializatory kuprofanowe.....	70
4.2.1.2.	Dializatory polisulfonowe.....	74
4.2.2.	Wartości klirensu rzeczywistego (K_D) i współczynnika przepuszczalności masowej (KoA) dla markera średnicząsteczkowego: kwasu foliowego.....	77
4.2.2.1.	Dializatory kuprofanowe.....	78
4.2.2.2.	Dializatory polisulfonowe.....	80
4.2.3.	Wartości stężeń witaminy B_{12} przed oraz za dializatorem.....	83
4.2.3.1.	Dializatory kuprofanowe.....	83
4.2.3.2.	Dializatory polisulfonowe.....	83
4.2.4.	WARTOŚCI PPV DIALIZATORÓW.....	84
4.2.4.1.	Dializatory kuprofanowe.....	84
4.2.4.2.	Dializatory polisulfonowe.....	84
4.3.	WYNIKI BADANIA BIOZGODNOŚCI BŁON DIALIZACYJNYCH.....	85
4.3.1.	Interleukina 6 (IL-6).....	85
4.3.2.	Czynnik martwicy nowotworów α (TNF α).....	87
4.3.3.	Graficzne przedstawienie, opracowanie statystyczne i omówienie wyników badania biozgodności błon dializacyjnych.....	89
4.3.3.1.	Interleukina 6 (IL-6).....	89
4.3.3.2.	Czynnik martwicy nowotworów α (TNF α).....	101
5.	DYSKUSJA WYNIKÓW.....	114
5.1.	OCENA POWIERZCHNI BŁON DIALIZACYJNYCH TECHNIKĄ AFM. OMÓWIENIE UZYSKANYCH WYNIKÓW.....	114
5.2.	WPŁYW REUTYLIZACJI DIALIZATORÓW NA KLIRENS WYBRANYCH TOKSYN MOCZNICOWYCH.....	118
5.3.	WPŁYW REUTYLIZACJI DIALIZATORÓW NA BIOZGODNOŚĆ BŁON DIALIZACYJNYCH.....	134
6.	WNIOSKI WYNIKAJĄCE Z PRACY.....	151
7.	PIŚMIENNICTWO.....	153
8.	STRESZCZENIE.....	167
9.	ABSTRACT.....	170

1. WSTĘP

1.1. Przewlekła niewydolność nerek problemem medycyny XXI wieku

Dzięki postępowi osiągniętemu w zakresie dializoterapii mocznica przestała być śmiertelnym zagrożeniem dla chorych z ONN i PNN. Jest to niewątpliwie jedno z największych osiągnięć nefrologii XX wieku. Dializoterapia jest współcześnie podstawową metodą nerkozastępczą, której poddawanych jest 77% spośród blisko 1,5 miliona pacjentów aktualnie leczonych nerkozastępczo na świecie. Zgodnie z prognozami, w ciągu kolejnych 10 lat liczba poddawanych terapii nerkozastępczej na świecie wzrośnie o kolejny milion osób, co zmusza nas do zastanowienia się nad przyszłością tego leczenia w okresie najbliższej dekady [158].

Leczenie nerkozastępcze w Polsce – a zwłaszcza dializoterapia - stało się metodą dostępną dla każdego, kto wymaga takiej formy terapii i nie ma bezwzględnych przeciwwskazań klinicznych [141, 142].

Liczba dializowanych na milion mieszkańców w Polsce wzrasta o 25 - 30 osób na rok (średni roczny przyrost wynosi 13,3%), a w latach 1992 - 2003 liczba chorych dializowanych wzrosła prawie siedemnastokrotnie [142]. Analizując dane demograficzne wskazujące na coraz szybsze starzenie się populacji Polski i Europy, dane dotyczące systematycznego wzrostu liczby chorych z powodu nefropatii cukrzycowej i nadciśnieniowej a także ze względu na coraz łatwiejszy i szerszy dostęp do sprzedawanych bez recepty niesteroidowych leków przeciwzapalnych - w ciągu najbliższych lat należy spodziewać się gwałtownego wzrostu liczby chorych z PNN wymagających dializy.

1.2. Hemodializa – dominującą formą leczenia nerkozastępczego

Dominującą formą terapii zarówno w Polsce, jak i w innych krajach Europy - a także w USA - pozostaje nadal hemodializa. Tą metodą na koniec 2003 roku w naszym kraju leczono 10343 pacjentów czyli 90,4% wszystkich chorych z SNN [142]. Współcześnie osiągnięto zadowalające krótkoterminowe efekty hemodializoterapii (złagodzenie objawów toksemii mocznicowej, korekcję kwasicy metabolicznej oraz zagrażających życiu zaburzeń elektrolitowych a także przywrócenie prawidłowego stanu wolemii). Pomimo postępu technologicznego, jaki dokonał się w ciągu ostatnich lat w dziedzinie dializoterapii, obecnie

zwraca się szczególną uwagę na odległe i długoterminowe skutki tego leczenia. Aktualnie celem terapii nerkozastępczej (w tym dializoterapii) jest zapewnienie chorym z SNN jak najlepszej jakości życia oraz zmniejszenie wciąż bardzo wysokiej chorobowości i śmiertelności.

1.3. Wyniki leczenia chorych dializowanych

Współczesna dializoterapia ma do rozwiązania wiele problemów, które wynikają między innymi z ciągle bardzo wysokiej i trudnej do zaakceptowania śmiertelności chorych. Współcześnie przyjęte standardy leczenia nerkozastępczego (choć niewątpliwie powinny zapewniać najwyższą jakość leczenia) nadal związane są z niezwykle wysoką śmiertelnością w populacji chorych dializowanych, wynoszącą blisko 20% rocznie [15].

Z uwagi na fakt, że co piąty chory pozostający w programie przewlekłej terapii nerkozastępczej umiera w ciągu roku, należy zadać sobie pytanie: Co może być przyczyną takiego stanu rzeczy? Dlaczego wyniki są tak złe, skoro mamy do czynienia z coraz to lepszymi urządzeniami służącymi terapii nerkozastępczej?

Po analizie aktualnego piśmiennictwa wydaje się, że przyczyn tego stanu rzeczy należy poszukiwać na dwóch głównych płaszczyznach. Po pierwsze - należy zastanowić się, czy chorzy z PNN rzeczywiście są tak skutecznie dializowani jak się powszechnie sądzi? Po drugie - spróbować określić, jaki jest stan immunologiczny chorych przewlekle dializowanych?

Od pewnego czasu zaczęto zwracać uwagę na kumulację w organizmie ludzi z PNN tzw. toksyn średnicząsteczkowych, które nie są skutecznie eliminowane w czasie konwencjonalnego zabiegu hemodializy. Coraz bardziej popularna tzw. „hipoteza średnich cząsteczek” wskazała na związki o masie cząsteczkowej powyżej 500 Da oraz na związki wiążące się z białkami surowicy, jako na główne czynniki sprawcze zwiększonej chorobowości i śmiertelności w populacji chorych hemodializowanych.

Powikłania sercowo – naczyniowe, będące następstwem rozwoju miażdżycy stanowią przyczynę 40 - 50% wszystkich zgonów w populacji chorych hemodializowanych. Natomiast zasadniczą przyczyną progresji zmian miażdżycowych jest przewlekły stan zapalny, który jest nasilany (a nie łagodzony) poprzez bioniezgodne leczenie nerkozastępcze - a przede wszystkim poprzez bioniezgodne błony dializacyjne.

1.4. Błona dializacyjna kluczem do skutecznej dializy

Jak już wspomniano, hemodializą jest leczony największy odsetek pacjentów z SNN. O jej skuteczności i biogodności decyduje w głównej mierze błona dializacyjna, która determinuje jakość oraz powodzenie całej terapii.

W okresie ostatnich 25 lat doszło do spektakularnego rozwoju technologii produkcji błon dializacyjnych. Dzięki temu lekarze i pacjenci otrzymali nową generację dializatorów, co znacznie poprawiło możliwości leczenia nerkozastępczego [18]. Nowoczesne błony dializacyjne zapewniają bezpieczeństwo zabiegu hemodializy oraz cechują się wysoką jakością tworzywa, z jakiego zostały wykonane. Charakterystyka błony dializacyjnej uwzględnia jej parametry dyfuzyjno – konwekcyjne (włączając w to wysoką przepuszczalność dyfuzyjną dla małych cząsteczek), selektywną przepuszczalność dla średnich i dużych cząstek - a także wysoką przepuszczalność dla wody, co umożliwia kontrolę procesu ultrafiltracji. Ponadto, producenci dializatorów zwracają coraz większą uwagę, aby fizyczne i chemiczne właściwości powierzchni kontaktującej się z krwią pacjenta nie zaburzały mechanizmów filtracyjnych błony, ani nie przyczyniały się do niekorzystnych reakcji ze strony organizmu chorego. Idealna błona powinna także usuwać określone związki z krwi pacjenta na drodze adsorpcji powierzchniowej. Jednakże zbyt duża adsorpcja (zwłaszcza białek) na powierzchni błony dializacyjnej jednocześnie zmniejsza jej skuteczność w usuwaniu pozostałych toksyn na drodze dyfuzji i/lub konwekcji [20, 152].

Błony dializacyjne w zależności od materiału, z jakiego są zbudowane dzielą się na trzy grupy: 1. Błony zbudowane z niemodyfikowanej celulozy; 2. Błony zbudowane ze zmodyfikowanej celulozy oraz 3. Błony syntetyczne.

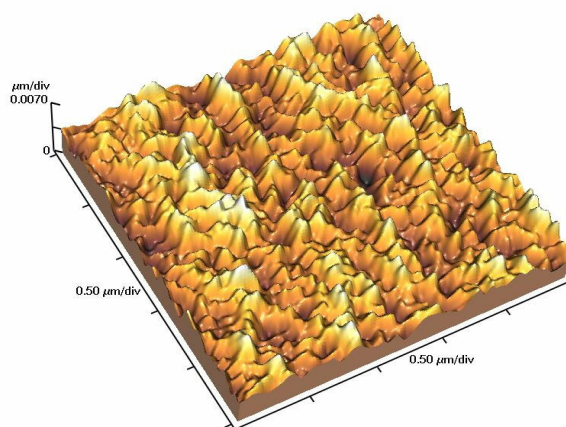
Z uwagi na fakt, że w niniejszej pracy badano nanostrukturę, wartości klirensów rzeczywistych oraz stopień biogodności błon wykonanych z niemodyfikowanej celulozy (kuprofanowych) oraz błon syntetycznych (polisulfonowych), które są najczęściej używane – poniżej zamieszczono ich krótką charakterystykę.

1.4.1. Błony celulozowe

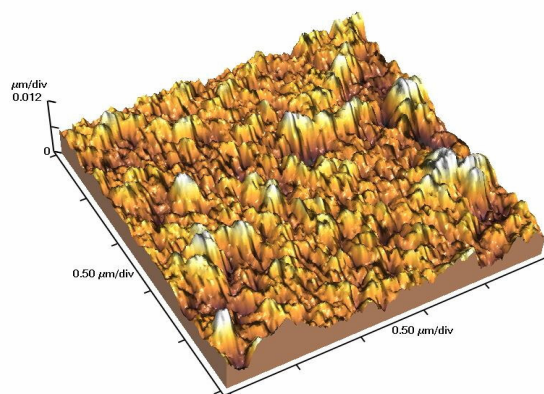
Błony celulozowe, (do których zaliczamy między innymi błony kuprofanowe) zbudowane są z powtarzających się podjednostek polisacharydowych, które bardzo przypominają swoją strukturą lipopolisacharydowe ściany bakterii i grzybów. Fakt ten może tłumaczyć często obserwowane gwałtowne pobudzenie układu immunologicznego chorego,

głównie na drodze alternatywnej aktywacji układu dopełniacza, podczas sesji hemodializy i stanowi o ich mniejszej (w porównaniu do innych błon) biogodności [61]. Pomimo tego błony celulozowe nadal zajmują bardzo istotne miejsce we współczesnej dializoterapii. Błony naturalne charakteryzują się małą grubością ściany kapilar oraz wysokim stopniem porowatości – co łącznie zapewnia bardzo dobre warunki dla procesu dyfuzji (głównego zjawiska fizycznego w dializie *low-flux*). Średnica kanałów błon celulozowych jest bardzo mała, błony te charakteryzują się znaczną hydrofilnością, a ich struktura jest symetryczna – czego rezultatem jest brak możliwości adsorpcji błonowej oraz przezbłonowego usuwania toksyn mocznicowych o większej masie cząsteczkowej [152, 153].

Za powszechnym stosowaniem błon celulozowych przemawiają argumenty natury czysto ekonomicznej. Dializatory celulozowe są dużo tańsze od swoich syntetycznych odpowiedników. W latach 90. XX wieku światowe koszty hemodializoterapii wyceniono na 500 miliardów dolarów. Dlatego stosowanie błon naturalnych może stanowić tańszą, rozsądną alternatywę zwłaszcza dla krajów uboższych, w których przede wszystkim czynnikiem ekonomicznym decyduje o rozpoczęciu i kontynuowaniu programu przewlekłych hemodializ [80]. Należy bowiem pamiętać, że w bardzo wielu krajach, szczególnie w Afryce i Azji, wciąż ogromna większość pacjentów ze SNN umiera bez możliwości uzyskania dostępu do leczenia nerkozastępczego [158].



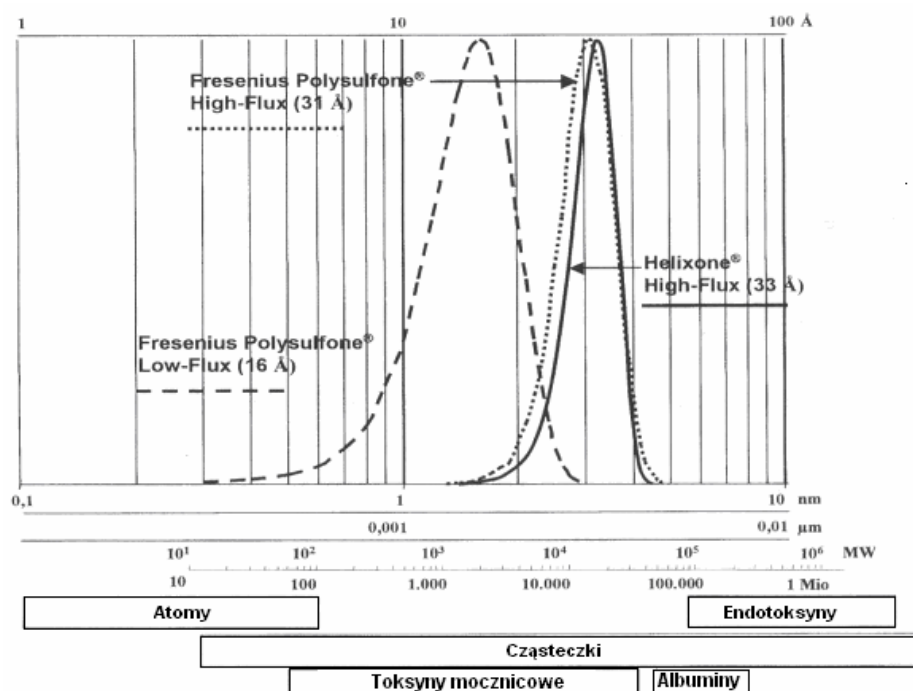
Ryc. 1. Kuprofan (błona symetryczna) – Powierzchnia wewnętrzna (AFM). Materiał własny.



Ryc. 2. Kuprofan (błona symetryczna) – Powierzchnia zewnętrzna (AFM). Materiał własny.

1.4.2. Błony syntetyczne

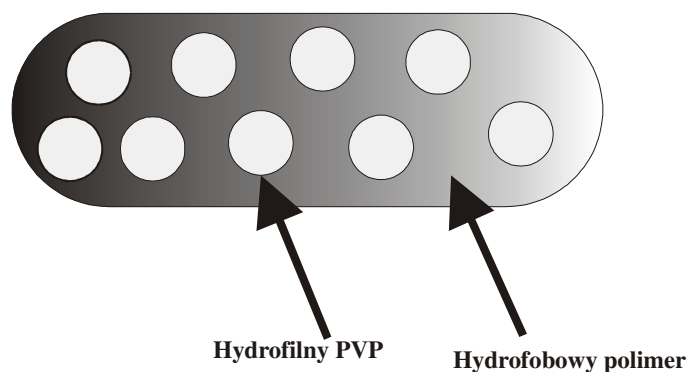
Syntetyczne błony dializacyjne charakteryzują się większą grubością ściany kapilar ($>20 \mu\text{m}$), a ich struktura może być symetryczna lub asymetryczna. Asymetryczną strukturę błony (np. polisulfonowej) tworzą cienka (ok. $1 \mu\text{m}$) warstwa tzw. „skórna” – bezpośrednio kontaktująca się z krwią pacjenta oraz warstwa podtrzymująca, która stanowi zewnętrzną warstwę ściany kapilary. Rola zewnętrznej warstwy, o luźniejszej strukturze polega przede wszystkim na wykorzystaniu jej własności adsorpcyjnych. Średnica kanałów błonowych powierzchni wewnętrznej błon *low-flux* wynosi około $10 - 20 \text{ \AA}$ (średnio 16 \AA), natomiast błon *high-flux* około $30 - 50 \text{ \AA}$ [18, 71, 152].



Ryc. 3. Spektrum dystrybucji wymiarów kanałów błonowych błon *low-flux*, *high-flux* oraz Helixone®. Średni wymiar kanałów w błonie Helixone wynosi 33 Å i jest większy aniżeli średni wymiar kanałów błony *high-flux* (31 Å). Średni wymiar kanałów błon *low-flux* wynosi zaledwie 16 Å. Przedruk za zgodą autorów [152].

Polimery polisulfonowe są hydrofobowe i samodzielnie stanowiłyby bardzo bioniezgodne tworzywo, o nienajlepszych parametrach dyfuzyjnych. W celu nadania hydrofilności - a tym samym poprawy dyfuzyjności cząstek hydrofilnych - w procesie produkcji do polimeru polisulfonowego dodawane są hydrofilne związki makromolekularne. Najpopularniejszym jest poliwinylpirolidon (PVP) [115]. Ostateczną strukturę oraz właściwości fizykochemiczne błony determinuje głównie proporcja PVP do hydrofobowego polimeru (np. polisulfonowego) oraz kinetyka jego precypitacji w trakcie procesu produkcji. Ostatecznym celem producentów błon dializacyjnych jest uzyskanie asymetrycznej, anizotropowej błony, która charakteryzuje się „gęstą” warstwą wewnętrzną (o rozmiarach porów 10 – 20 Å) oraz luźną zewnętrzną warstwą podtrzymującą, która poprawia właściwości ultrastrukturalne błony, nie pogarszając przy tym jej parametrów ultrafiltracji [115, 152]. Hydrofilne i hydrofobowe właściwości powierzchni błon syntetycznych stwarzają liczne możliwości poprawy ich biozgodności. PVP zwiększając hydrofilność błony, zapewnia obecność przypowierzchniowej warstwy wody niezbędnej do procesu dyfuzji - a jednocześnie zmniejsza adsorpcję białek i elementów komórkowych do powierzchni błony. Natomiast obszary hydrofobowe zmniejszają adhezję płytek krwi do hydrofilnych kanałów błonowych.

Optymalne proporcje hydrofilnych i hydrofobowych obszarów określane są jako tzw. mikrodomena [115].



Ryc. 4. Schematyczne przedstawienie mikrodomeny (struktura powierzchni błony dializacyjnej, która składa się z odpowiedniej proporcji hydrofilnego PVP i hydrofobowego polimeru) [115].

Okano i wsp. wykazali, że optymalne zmniejszenie aktywacji i adhezji płytek krwi oraz zmniejszenie adsorpcji białek do powierzchni błony uzyskuje się w momencie, kiedy hydrofilne i hydrofobowe mikrodomeny rozmieszczone są w zakresie 10 nm [127].

W celu poprawy biogodności producenci błon rozwinęli techniki mające na celu zredukowanie niekorzystnych interakcji zachodzących na skutek kontaktu krwi pacjenta z błoną dializacyjną, przezbłonowego transferu endotoksyn bakteryjnych oraz ładunku powierzchni błony. Z tabeli 1 wynika, że polimer polisulfonowy znacznie przewyższa pozostałe tworzywa pod względem stopnia adsorpcji endotoksyn bakteryjnych [18].

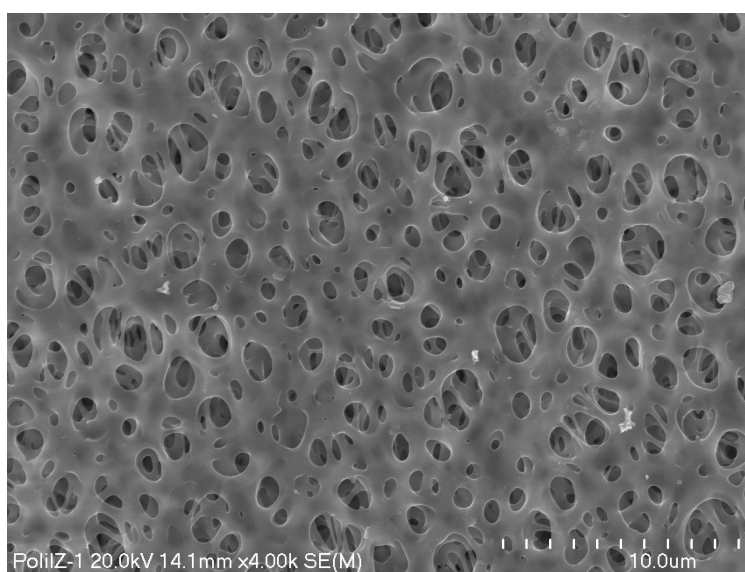
Zdolność do adsorbowania niektórych substancji przez błony dializacyjne jest bardzo cenną własnością, gdyż wpływa na poprawę stopnia ich biogodności. W dializacji oprócz bakterii mogą znajdować się także endotoksyny bakteryjne (tzw. substancje indukujące cytokiny - CIS). Komórki bakterii są zbyt duże aby mogły przeniknąć przez błonę lecz wielkość cząsteczek endotoksyn bakteryjnych jest już znacznie mniejsza i teoretycznie mogą one swobodnie przenikać przez pory błony polisulfonowej. Przenikanie CIS przez błonę na

drodze dyfuzji lub konwekcji (tzw. zjawisko *backfiltration*) odgrywa znaczącą rolę w patogenezie ostrych i przewlekłych powikłań hemodializoterapii.

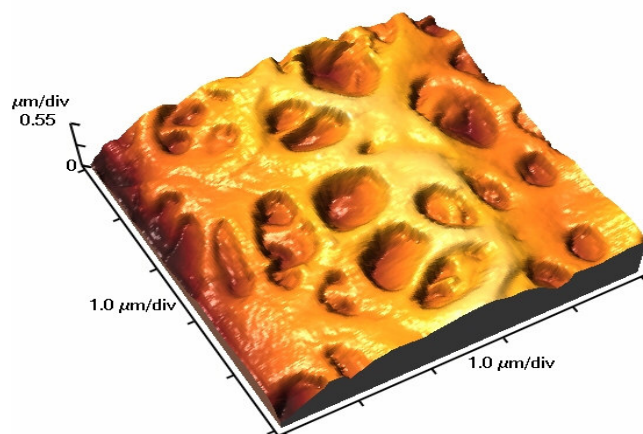
W zewnętrznej warstwie błony polisulfonowej znajdują się pory o bardzo dużej średnicy, struktura polimeru jest w tym regionie mniej zwarta i praktycznie nie zawiera hydrofilnych cząstek PVP. Dzięki tym cechom budowy błony istnieje możliwość skutecznej adsorpcji CIS i zapewnienie choremu bezpiecznego przebiegu zabiegu hemodializy [115, 153]. Takich własności nie posiadają błony celulozowe o symetrycznej strukturze.

Tab. 1. Zdolność adsorpcji endotoksyn *Pseudomonas aeruginosa* (Lipid A, LPS) przez różne błony dializacyjne. Stopień adsorpcji mierzono po 2 godzinach inkubacji. Zmodyfikowano na podstawie [18].

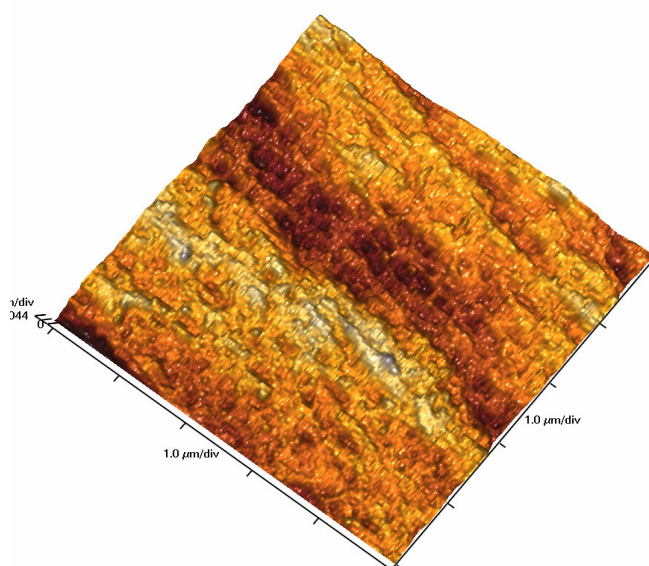
Błona dializacyjna	Lipid A ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	LPS (ng/m^2)
Kuprofan (E3)	$4,5 \pm 3,4$	91 ± 29
PS <i>low-flux</i> (F4)	$36,8 \pm 8,1$	360 ± 42
Octan celulozy	$11 \pm 1,3$	90 ± 42
Poliamid	$61,1 \pm 10,8$	352 ± 123
PS <i>high-flux</i> (F40)	$50,3 \pm 7,7$	502 ± 86



Ryc. 5. Polisulfon (błona asymetryczna) - Powierzchnia zewnętrzna (SEM). Materiał własny.



Ryc. 6. Polisulfon (błona asymetryczna) - Powierzchnia zewnętrzna (AFM). Materiał własny.

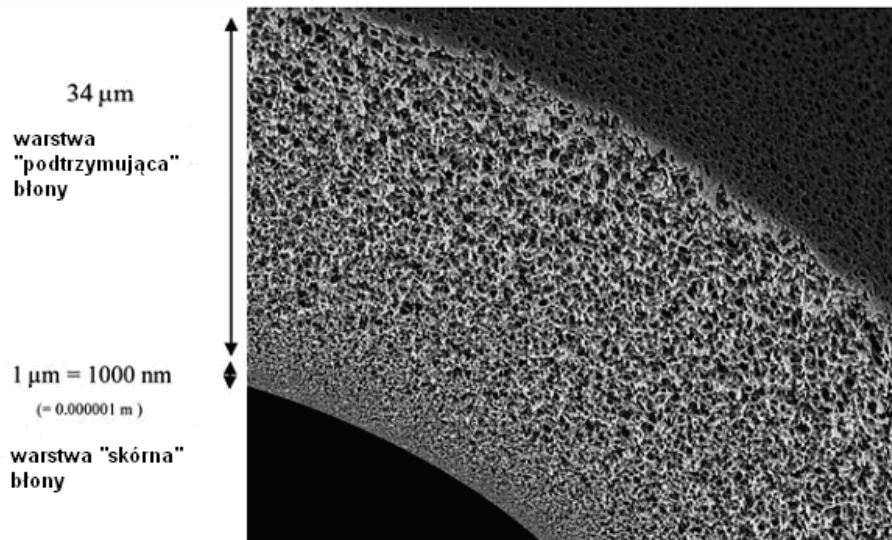


Ryc. 7. Polisulfon (błona asymetryczna) - Powierzchnia wewnętrzna (AFM). Materiał własny.

Powierzchnię błon polisulfonowych charakteryzuje braku ładunku elektrostatycznego. Z punktu widzenia zabiegu hemodializy jest to bardzo cenna właściwość biologiczna. Jak wykazano, obojętna elektrostatycznie powierzchnia błony zapobiega aktywacji czynnika Hagemana i wydzielaniu bradykininy, co zapewnia bezpieczeństwo chorym hemodializowanym i jednocześnie leczonym inhibitorami konwertazy angiotensyny [115].

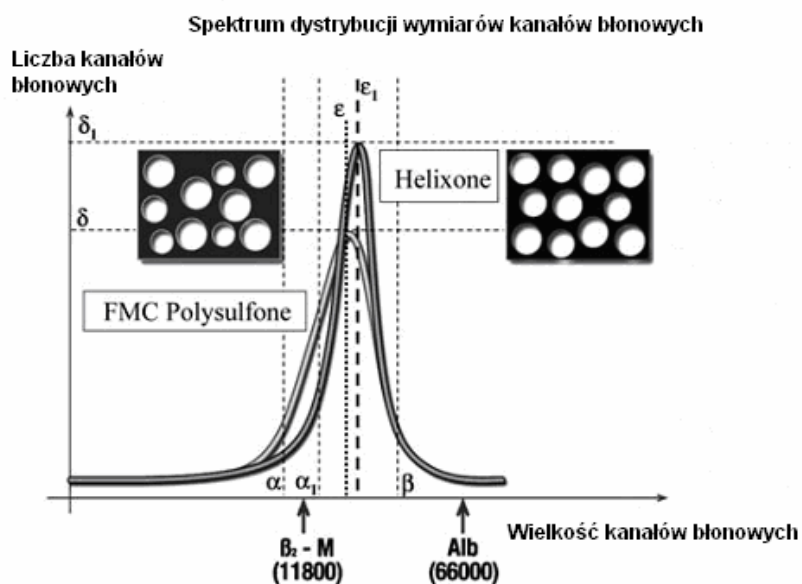
Występowanie niebezpiecznych dla chorych tzw. ostrych reakcji pierwszego użycia dializatora związane jest z obecnością pozostałości tlenku etylenu (ETO) - powszechnie stosowanego w procesie fabrycznej sterylizacji dializatorów. Z kolei sterylizacja promieniowaniem jonizującym może prowadzić do strukturalnych zmian polimerów tworzących błonę, natomiast sterylizacja parą wodną - z uwagi na swoją obojętność biologiczną i bezpieczeństwo - jest aktualnie najbardziej preferowaną metodą wyjąławiania błon dializacyjnych w procesie produkcji dializatorów i być może stanie się wkrótce metodą podstawową. Niektóre syntetyczne polimery (poliakrylonitryl, poliamid) nie mogą być ze względów technicznych sterylizowane parą wodną. Polimery z rodziny polisulfonu, jako jedyne na rynku, można poddawać sterylizacji wszystkimi trzema metodami [18]. Ponadto każdy rodzaj sterylizacji w określony sposób modyfikuje fizykochemiczne własności każdego typu błony, wpływa na ich ładunek powierzchniowy, stopień i rodzaj adsorpcji mediatorów zapalnych - co później znajduje wyraz w profilu ich biogodności [4, 5, 6].

Stosunkowa młoda dziedzina nauki jaką jest nanotechnologia zdążyła już znaleźć istotne miejsce w leczeniu nerkozastępczym. Dzięki niej mogła powstać najnowocześniejsza błona dializacyjna Helixone®. Jest to błona polisulfonowa *high-flux*, której rozkład, morfologia i wielkość porów wewnętrznej powierzchni kapilary są kontrolowane na poziomie nanometrów. Ten rodzaj błony produkowany jest przy wykorzystaniu tzw. procedury NCS (*nanocontrol spinning*) [155], która umożliwia szczegółowy nadzór i kontrolę nad liczbą, średnicą oraz morfologiczną charakterystyką porów błony dializacyjnej [154]. Dzięki tej technologii zbudowano błonę o zwiększonym zagęszczeniu porów na powierzchni wewnętrznej kapilary, przy jednoczesnym zmniejszeniu spektrum ich średnicy, koncentrując się wokół pożądanej wartości średnicy kanałów wewnątrzłonowych. Taka konstrukcja nanostruktury błony dializacyjnej umożliwia swobodne usuwanie toksyn średnicząsteczkowych [współczynnik przesiewalności (Sc) np.: dla β 2M wynosi 0,8], przy jednoczesnym braku utraty albumin do dializatu (Sc dla albumin wynosi 0,001) [147, 152, 155].



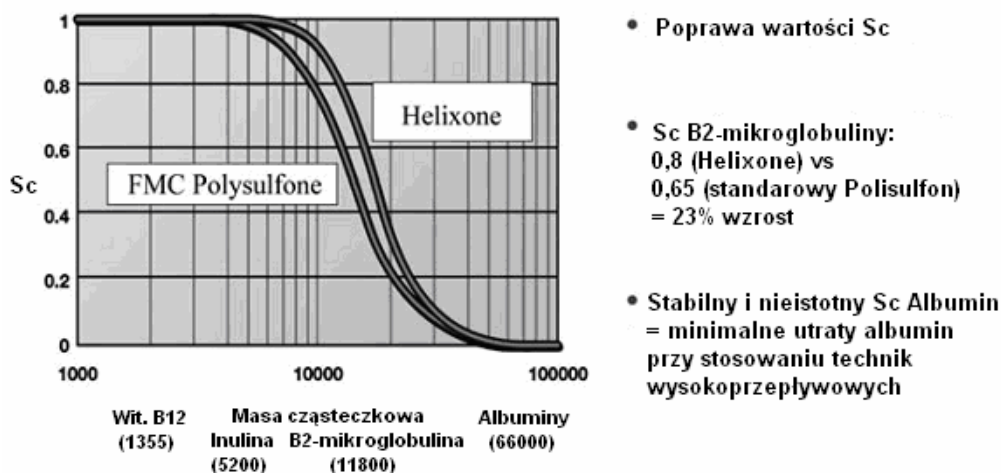
Ryc. 8. Przekrój poprzeczny przez błonę Helixone®. Błona zbudowana jest z bardzo wąskiej warstwy wewnętrznej (1 μm) oraz otaczającej zewnętrznej (34 μm). O parametrach (wartościach klirensów) błony decyduje przede wszystkim jej warstwa wewnętrzna. Przedruk za zgodą autorów [154].

Nanoskopowa kontrola porowatości wewnętrznej warstwy kapilary dializatora - umożliwia osiągnięcie wartości klirensów bardzo podobnych do tych, jakie spotyka się w kłębuszkach nerkowych w warunkach fizjologicznych (punkt odcięcia dla zdrowego kłębuszka – około 58000 Da). Zbliży to naukowców do uzyskania możliwości oczyszczania porównywalnej ze stanem fizjologii i w nieodległej przyszłości może stanowić niewyobrażalną wręcz korzyść dla chorych z SNN [152, 154].



Ryc. 9. Schematyczne przedstawienie korzyści uzyskanych dzięki technice NCS pod względem: liczby, rozkładu średnicy oraz średniej wielkości porów. Przedruk za zgodą autorów [154].

Współczynnik przesiewalności (Sc) błon:
Helixone vs standardowy Polisulfon



Ryc. 10. Technika NCS (błona Helixone®) vs standardowa błona polisulfonowa (*high-flux*). Uzyskano poprawę wskaźnika przesiewalności dla toksyn średnio- i wysoko-cząsteczkowych, bez zwiększenia (a nawet ją redukując) utraty albumin. Przedruk za zgodą autorów [154].

Kolejnych informacji o unikalnej strukturze błony Helixone® dostarcza jej analiza przy pomocy mikroskopu TEM. W odróżnieniu od dotychczas produkowanych błon dializacyjnych, błona Helixone® nie tylko charakteryzuje się dużą porowatością powierzchni wewnętrznej (mniej polimeru, więcej porów), lecz także szybkim zwiększaniem się stopnia porowatości w kierunku wnętrza błony już na odcinku pierwszych 500 nm, co pozwala na bardziej swobodne przenikanie cząstek w obręb ściany kapilary. Wewnętrzny region błony starszej generacji charakteryzował się większą gęstością na odcinku pierwszych 1000 – 2000 nm, co przyczyniało się do wzrostu oporów przenikania usuwanych w procesie hemodializy cząsteczek. Rezultatem zmiany technologii jest poprawa wartości klirensu zarówno dla małych jak i dużych cząsteczek [19].

Ogólna charakterystyka nanostruktury badanych przy użyciu mikroskopu sił atomowych dwóch błon: standardowej błony polisulfonowej *high-flux* oraz błony Helixone® nie wykazuje znamiennych różnic. Niemniej jednak, wewnętrzna powierzchnia błony Helixone® jest gładsza, bardziej jednolita a zatem bardziej biozgodna - na co wskazuje wartość RMS, która dla Helixone® jest mniejsza (wartość RMS Helixone® -126 nm; RMS standardowej błony polisulfonowej *high-flux* – 188 nm) [20, 152].

We współczesnej dializoterapii na przestrzeni ostatnich kilku lat zaistniała możliwość korzystania z dializatorów, których błona filtracyjna bardzo zbliżyła się swoimi parametrami do naturalnego idealnego w swojej budowie i funkcji ludzkiego kłębuszka nerkowego.

Dzięki intensywnemu rozwojowi nanotechnologii przed lekarzami oraz pacjentami otworzyła się możliwość korzystania z nowoczesnych błon dializacyjnych, których struktura jest asymetryczna, zabezpieczająca chorych przed endotoksynami bakteryjnymi, z błon o doskonałym profilu biozgodności, o większej średnicy porów umożliwiającymi usuwanie toksyn o ściśle zdefiniowanej masie cząsteczkowej, nie narażając jednocześnie chorych na utratę ich własnych albumin, a także z błon o homogennej dystrybucji porów na wewnętrznej powierzchni kapilary [147].

W okresie minionej dekady można było zauważyć istotne zmiany, jakie dokonały się zarówno w obrębie populacji chorych dializowanych jak i samego sprzętu wykorzystywanego w przewlekłej dializoterapii. Obecnie na rynku dostępne jest bardzo szerokie spektrum dializatorów wielu producentów. Począwszy od dializatorów *low-flux*, wykonanych z niemodyfikowanej celulozy (bio niezgodnych, bez możliwości adsorpcji endotoksyn bakteryjnych z dializatu oraz pozbawionych możliwości usuwania toksyn średnicząsteczkowych) poprzez produkty pośredniej klasy - aż do filtrów *high-flux* wykonanych z wysoce biozgodnych tworzyw syntetycznych [17].

Pojawiły się nowe tworzywa, które umożliwiły rozwój hemodializy przesuając siłę ciężkości z procesu dyfuzji (skutecznej w usuwaniu małych cząsteczek) w kierunku technik konwekcyjnych i tym samym przetrwały drogę nowym technikom dializacyjnym (dializa *high-flux*, hemofiltracja, hemodiafiltracja). Pozwoliło to na zaoferowanie ciężko chorym ludziom lepszej jakościowo, skuteczniejszej i bezpieczniejszej dializy poprzez usuwanie tzw. toksyn średnicząsteczkowych [17, 147].

Dalszy rozwój myśli technologicznej w tym kierunku jest jak najbardziej pożądanym, gdyż to właśnie od rodzaju błony tworzącej kapilarę dializatora w decydującej mierze uzależnione są bliskie i odległe sukcesy lub porażki całego trudnego procesu, jakim jest przewlekła terapia nerkozastępcza. Wszystkie nowe technologie, które są wprowadzane w zakresie dializoterapii pozwalają na znaczne wydłużenie życia pacjentów oraz poprawę jego jakości - ale ich niewątpliwą i znaczącą wadą jest coraz to wyższy koszt takiego leczenia.

1.5. Możliwości badania powierzchni błon dializacyjnych

Od fizycznych właściwości opisanych współczynnikami przepuszczalności masowej dializatora (KoA) i ultrafiltracji (Kufr) zależy wielkość usuwanych cząstek toksyn mocznicowych. Na pogorszenie charakterystyki błony dializacyjnej ma wpływ wiele czynników. Kontakt z krwią prowadzi z reguły do zjawisk wykrzepiania, nie w pełni kontrolowanych nawet przez optymalną heparynizację. W wyniku kontaktu krwi z błoną dializacyjną dochodzi na jej powierzchni do szybkiej adsorpcji białek osocza. Zjawisko to ma charakter kowalencyjny oraz niekowalencyjny. Dzięki technice skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) wykazano obecność biofilmu na prawie każdej powierzchni kontaktującej się z krwią. Wykorzystując technikę mikroskopu fluorescencyjnego dokonano jakościowej oraz ilościowej charakterystyki tego biofilmu [125].

Niemniej jednak, zależności pomiędzy nanostrukturą błony dializacyjnej a reakcjami ze strony organizmu pacjenta nie były jak dotąd przedmiotem badań. Na istnienie zależności pomiędzy szorstkością powierzchni błony dializacyjnej a stopniem jej biozgodności opisanej jako wskaźnik adhezywności płytek do jej powierzchni zwrócono po raz pierwszy uwagę w 1999 roku [179]. Wobec pojawiających się w piśmiennictwie sugestii, że szorstkość powierzchni błony (wyrażona jako wartość RMS) może ściśle wiązać się z jej biozgodnością oczekiwano, że badania powierzchni kapilar techniką mikroskopii sił atomowych powinny dostarczyć nowych dowodów na wpływ fizycznej charakterystyki błony na to zjawisko.

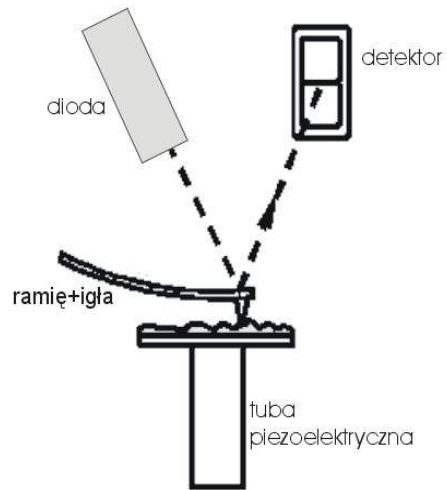
Próby kompleksowego porównania wartości RMS dwóch najczęściej stosowanych w naszym kraju typów błon dializacyjnych o mniejszej biozgodności (kuprofan) oraz uznanych za biozgodne (polisulfon), a ponadto poszukiwanie odpowiedzi na pytanie: Czy i w jaki sposób zmienia się charakterystyka powierzchni badanych błon po zabiegu hemodializy przy wielokrotnej reutilizacji kwasem nadoctowym oraz czy rzeczywiście istnieje korelacja pomiędzy szorstkością powierzchni kapilary dializatora wyrażonej wartościami RMS a stopniem jej biozgodności wyrażonej stężeniami interleukiny 6 (IL-6) oraz czynnikiem martwicy nowotworów α (TNF α)? - wydały się interesujące z badawczego punktu widzenia.

1.5.1. Zasada działania mikroskopu sił atomowych

Mikroskop sił atomowych (AFM), który należy do rodziny mikroskopów skaningowych bliskich oddziaływań (SPM) wydaje się być najbardziej optymalnym narzędziem do badania nanostruktury oraz szorstkości powierzchni. AFM w przeciwieństwie do mikroskopu optycznego czy elektronowego, tworzy trójwymiarowe obrazy bez użycia układu szklanych, bądź magnetycznych soczewek, ale za pomocą ostrej igły (ostrza). Wyeliminowane zostały ograniczenia rozdzielczości związane z długością fali i efektami interferencyjnymi, jakie miały miejsce w klasycznych metodach mikroskopowych. Rozdzielczość obrazów AFM, w znaczny sposób determinowana przez kształt ostrza, jest znacznie większa od rozdzielczości uzyskiwanej w innych mikroskopach (maksymalna rozdzielczość pozioma: 0,20 nm; maksymalna rozdzielczość pionowa: 0,01 nm). Przygotowanie materiału do badania nie wymaga niszczącej preparatyki, takiej jak odwadnianie, liofilizacja czy też powlekanie preparatu warstwą przewodzącą. Dodatkowo technika AFM ma możliwości nie tylko tworzenia precyzyjnych przestrzennych obrazów powierzchni, ale również badania jej właściwości chemicznych i mechanicznych oraz oddziaływań międzymolekularnych.

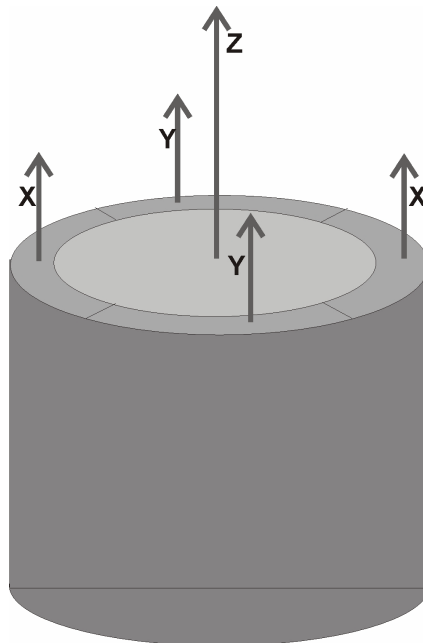
Mikroskop sił atomowych bada powierzchnię próbki za pomocą ostrza umieszczonego na bardzo elastycznym ramieniu (dźwigni - *cantilever*), które jest głównym elementem odbierającym informację o badanej powierzchni. Ostrze stanowi tę część układu skanującego AFM, która bezpośrednio oddziałuje z powierzchnią próbki. Każdy punkt w obrazie reprezentuje przestrzenny splot kształtu ostrza i kształtu obrazowanych cech. Najczęściej ostrze ma kształt stożka, z bardzo ostrym zakończeniem, dzięki czemu podczas skanowania rozróżnia dwa blisko leżące elementy powierzchni.

Wielkość odkształcenia (wygięcia) ramienia wynikająca ze zmiany oddziaływania między ostrzem a powierzchnią jest odpowiednio monitorowana poprzez układ pomiarowy. Istnieje kilka sposobów rejestracji ruchu ramienia, które można podzielić na metody optyczne i elektryczne. Jedną z metod optycznych jest metoda detekcji wiązki laserowej. Wiązka emitowana z lasera półprzewodnikowego pada na koniec ramienia, odbija się i trafia do pozycyjnie czułego detektora. Podczas skanowania, w wyniku ruchu ramienia zmienia się kąt odbicia wiązki, a tym samym miejsce padania w detektorze.



Ryc. 11. Schemat budowy mikroskopu sił atomowych zaczerpnięty z [175] – opublikowano za zgodą autorów.

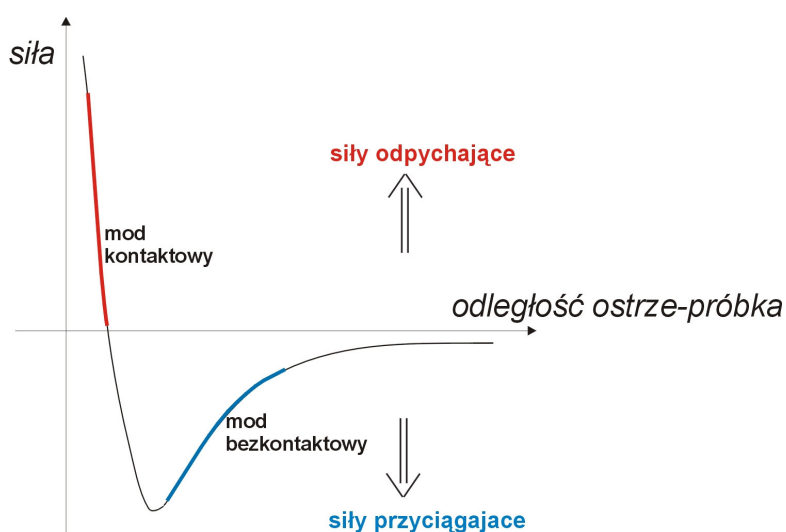
Detektor stanowi fotodioda podzielona na cztery segmenty, dzięki czemu pozwala na rozróżnienie pionowego i poziomego ruchu ramienia. Opisana powyżej metoda detekcji jest bardzo czuła. Sam detektor pozwala na rejestrację przemieszczenia wiązki o wielkość rzędu 10^{-9}m [105].



Ryc. 12. Tuba piezoelektryczna.

Siła oddziaływania między ostrzem a próbką zależy od ich wzajemnej odległości, dlatego bardzo ważne jest, aby bardzo dokładnie określić położenie igły w stosunku do powierzchni próbki. Realizuje się to poprzez umieszczenie próbki na tubie piezoelektrycznej (ryc.12.), która zbudowana jest z czterech części połączonych wzdłuż osi tuby. Wykorzystując zjawisko piezoelektryczne, poprzez przyłożenie odpowiedniego napięcia do każdej części tuby możemy zmieniać położenie próbki, a przez to kontrolować jej ruch w trzech ortogonalnych kierunkach: x , y , z . Kierunek „ z ” odpowiada przesuwaniu się próbki w kierunku pionowym, czyli w tym kanale zachodzi bezpośrednia kontrola odległości igła - powierzchnia próbki. Skanowanie „linia po linii” w wybranym obszarze próbki odbywa się poprzez ruch próbki w płaszczyźnie „ xy ” (kanał x i kanał y).

Wielkością skanowaną podczas badania AFM jest siła, z jaką ostrze oddziałuje z powierzchnią próbki. Największy wkład do oddziaływania między atomami końca ostrza, a atomami powierzchni mają siły elektrostatyczne (Coulombowskie), siły odpychające i przyciągające siły van der Waalsa, które można opisać potencjałem Lenarda–Jonesa, co przedstawia ryc.13 [32, 33, 144, 175].



Ryc. 13. Zależność oddziaływania między ostrzem a próbką od odległości między nimi.

Oddziaływanie między ostrzem a powierzchnią ściśle zależy od ich wzajemnej odległości, dzięki czemu wykrywalne są nawet najmniejsze zmiany w topografii. Podczas zbliżania ostrza do próbki atomy znajdujące się na końcu ostrza zaczynają oddziaływać z atomami

powierzchni badanej próbki. W zależności od tego czy siły oddziaływania między atomami ostrza i powierzchni leżą w zakresie sił przyciągających czy odpychających, mikroskop może pracować w trybie kontaktowym (siły odpychające) lub w trybie bezkontaktowym (siły przyciągające).

1.5.1.1. Tryby pracy ostrza AFM

Tryb kontaktowy

W trybie kontaktowym ostrze umieszczone na ramieniu o niskiej stałej sprężystości, zbliża się do powierzchni próbki na odległość rzędu 10^{-10} m. W tym zakresie odległości na ostrze działają siły odpychające. Podczas skanowania, wskutek różnic w wysokości powierzchni, zmienia się siła oddziaływania ostrze – powierzchnia i ramię odpowiednio odkształca się.



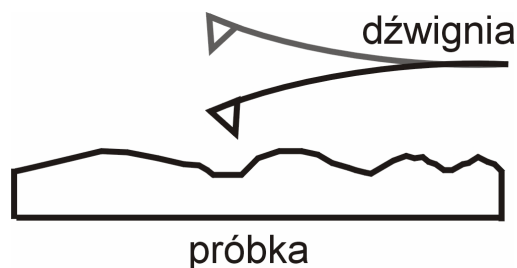
Ryc. 14. Tryb kontaktowy.

W tym trybie odgięcie ramienia jest użyte jako sygnał wejściowy do pętli sprzężenia zwrotnego, która porusza skanerem „górze - dół” w odpowiedzi na topografię powierzchni, aby utrzymać stałe odgięcie ramienia. Obraz jest generowany z ruchu skanera (tuby piezoelektrycznej), natomiast siła wywierana na próbkę jest stała. Tryb kontaktowy może być stosowany do badania próbek biologicznych zarówno w powietrzu, jak i w cieczy [105, 164].

Tryb bezkontaktowy

W trybie bezkontaktowym ostrze nie wchodzi w fizyczny kontakt z badaną powierzchnią, ale porusza się nad nią w odległości od 10 do 100 nm (ryc. 15). Zgodnie z wykresem siła – odległość (ryc. 13), na ostrze działają siły przyciągające. Są one słabsze niż

siły działające w trybie kontaktowym, co powoduje, że zmiany oddziaływania między ostrzem a powierzchnią nie mogą być monitorowane przez detekcję odkształceń ramienia.



Ryc. 15. Tryb bezkontaktowy.

Ostrze umieszczone jest na ramieniu o niskiej stałej sprężystości, które wprowadza się w drgania (z częstotliwością i amplitudą charakterystyczną dla danego ramienia). Podczas badania, gdy próbka przesuwa się pod drgającym ostrzem, zmienia się częstość własna drgań ramienia wskutek zmiany siły oddziaływania między ostrzem a powierzchnią próbki, będącej wynikiem zmiany odległości ostrze - powierzchnia. Tak więc, kontrolując oscylacje ramienia otrzymujemy informację o topografii. Tryb bezkontaktowy jest techniką pozwalającą badać powierzchnię próbki z wysoką rozdzielczością. Podczas badania ostrze nie dotyka próbki, co stanowi istotny atut dla badań biologicznych, gdzie badany materiał odznacza się małą odpornością na uszkodzenia [139, 175].

1.6. Toksyny mocznicowe, klirens związków nisko- i średniocząsteczkowych

Pojęcie zatrucia mocznicowego związanego z obecnością w płynach ustrojowych toksyn mocznicowych znane jest od opisanie tego zespołu przez Richarda Brighta w pierwszej połowie XIX wieku [159].

Do mechanizmów prowadzących do kumulacji toksyn mocznicowych należy zaliczyć retencję substancji wydalanych w warunkach fizjologii przez nerki, upośledzoną degradację związków przez niewydolne nerki, zainicjowanie lub zwiększenie produkcji określonych substancji jako próby wyrównywania przez ustrój zaburzeń homeostazy wywołanych przez PNN (*trade off hypothesis*) oraz gromadzenie w płynach ustrojowych i/lub tkankach substancji dostarczanych w czasie odżywiania lub leczenia [159].

Do klasycznych kryteriów kwalifikacji danej substancji jako toksyny mocznicowej zalicza się jej własności chemiczne, obecność w płynach i tkankach ustrojowych oraz zmianę stężeń u

pacjentów z PNN korelującą z rozwojem objawów lub zmian narządowych. Odrębnym kryterium jest toksyczny efekt działania tej substancji użytej w stężeniach obserwowanych u chorych z mocnicą, znajdujący potwierdzenie w badaniach *in vivo* na zwierzętach i/lub za pomocą odpowiednich modeli *in vitro* [159].

W toku wielu lat badań nad zatruciem mocznicowym podawano szereg podziałów toksyn mocznicowych. Najbardziej szczegółowa klasyfikacja została opracowana przez Europejską Grupę Roboczą ds. Toksyn Mocznicowych (EUTox) [184, 187]. Ogółem na liście EUTox zamieszczono ponad 90 substancji dzieląc je na trzy grupy. Najwięcej, gdyż ponad 40 związków znalazło się w grupie 1., którą stanowią substancje niskocząsteczkowe rozpuszczalne w wodzie, o masie cząsteczkowej do 500 Da (np.: mocznik, pochodne guanidynowe). Związki z tej grupy bardzo łatwo można eliminować z ustroju stosując już standardowe błony dializacyjne *low-flux*. Do 2. grupy małych, rozpuszczalnych w wodzie wiążących się z białkami związków o masie cząsteczkowej do 500 Da zakwalifikowano łącznie 23 substancje. Usuwanie tych cząsteczek jest znacznie utrudnione ze względu na ich wiązanie się z białkami i to niezależnie od rodzaju użytej błony dializacyjnej. Powoduje to, że ta grupa związków zachowuje się podobnie jak związki o dużej masie cząsteczkowej. Kolejną 3. grupę stanowią tzw. „średnie cząsteczki”, do których zalicza się 20 substancji o masie cząsteczkowej od 500 do 12 000 Da [159, 189]. Związki z tej grupy można usunąć jedynie przy wykorzystaniu błon *high-flux* oraz błon o wysokich własnościach adsorpcyjnych [182].

Za toksyczność odpowiedzialne są również związki nieorganiczne. Zalicza się do nich jony potasu, wapnia, sodu, magnezu, wodoru, nieorganiczne fosforany oraz wodę. Wyrównywanie zaburzonych proporcji i stężeń powyższych substancji dokonuje się stosunkowo szybko poprzez kontakt z płynem dializacyjnym o właściwym składzie, gdyż wszystkie wymienione toksyny są małe i bardzo dobrze rozpuszczalne w wodzie [183]. Woda jest skutecznie usuwana na drodze ultrafiltracji. Nie do końca rozwiązano kwestię eliminacji nieorganicznych fosforanów ze względu na złożony charakter zjawisk towarzyszących ich eliminacji.

Jednocześnie wiadomo już od wielu lat, iż nawet najlepiej prowadzone leczenie za pomocą dializoterapii nie pozwala na całkowite wyeliminowanie toksyn mocznicowych. Ponadto dwie zasadnicze metody – hemodializa i dializa otrzewnowa – różnią się pod względem zdolności do usuwania poszczególnych substancji. Podczas hemodializy łatwiej eliminowane są związki niskocząsteczkowe aniżeli średnie cząsteczki. Te ostatnie lepiej usuwane są podczas dializy otrzewnowej [58, 159, 188].

Istnieją trzy zasadnicze grupy czynników, od których uzależniony jest stopień eliminacji poszczególnych toksyn mocznicowych. Pierwsza - związana jest z samą substancją toksyczną. Od charakteru toksyny, jej wielkości i własności fizykochemicznych zależy bowiem nie tylko szybkość kumulacji ale także możliwość jej eliminacji z tkanek oraz płynów ustrojowych. Druga grupa czynników zależy od stanu klinicznego chorego. Zalicza się do nich mniejszą lub większą zdolność do generowania przez ustrój samych toksyn, a także możliwość ich samodzielnej eliminacji (np. resztkowa funkcja nerek). Również takie czynniki jak masa ciała czy objętość dystrybucji w zasadniczy sposób wpływają na całkowitą pulę toksyn, ich rozmieszczenie w ustroju oraz możliwości usuwania. Trzecia grupa czynników związana jest z samym procesem dializy. W przypadku hemodializy usuwanie poszczególnych substancji zależy w zasadniczym stopniu od użytego dializatora – a ściślej od rodzaju błony, z której został wykonany. Udowodniono, że szereg substancji znacznie sprawniej usuwanych jest za pomocą dializatorów, w których zastosowano błony syntetyczne o wysokim współczynniku przepuszczalności aniżeli podczas stosowania niskoprzepływowo błon naturalnych [159].

Hemodializa klasyczna z wykorzystaniem błon *low-flux* jest obecnie najczęściej stosowaną techniką hemodializy. Jest to dializa z wykorzystaniem błon o niskim współczynniku ultrafiltracji (3 - 10 ml/h/mmHg), których średnica kanałów filtracyjnych nie przekracza 20 Å, usuwających substancje o masie cząsteczkowej znacznie poniżej 1 kDa, głównie na drodze dyfuzji. W dializie *low-flux* przepływ krwi zazwyczaj nie jest większy niż 300 ml/min a przepływ płynu dializacyjnego wynosi 500 ml/min.

Na drugim biegunie technik hemodializacyjnych znajduje się hemodializa wysokowydajna – czyli dializa z wykorzystaniem dializatora zbudowanego z błony o wysokim współczynniku ultrafiltracji (20 - 60 ml/h/mmHg), których średnica kanałów filtracyjnych może wynosić nawet 50 Å, zdolną usunąć substancje o masie cząsteczkowej 20 – 30 kDa. W dializie *high-flux* dla uzyskania większej wydajności zabiegu często stosuje się wysoki przepływ krwi (> 500 ml/min) i płynu dializacyjnego (700 - 800 ml/min) a mechanizmem usuwania cząstek staje się konwekcja [203].

Niemniej jednak, niezależnie od rodzaju zastosowanej techniki dializacyjnej oraz jej efektywności - nie udaje się całkowicie wyeliminować z ustroju znakomitej większości toksyn mocznicowych. Dlatego też stan, który obserwuje się u pacjentów poddawanych dializoterapii można uznać za rodzaj zmodyfikowanej mocznicy. Całkowitą eliminację zatrucia mocznicowego można osiągnąć jedynie po udanym przeszczepieniu nerki [159].

Współcześnie uważa się, że o skuteczności eliminacji toksyn mocznicowych decyduje klirens dializatora (K_D). Od jego rzeczywistej wartości zależy ilość usuwanych w czasie zabiegu hemodializy toksyn mocznicowych. Każdy producent dializatorów przedkłada wraz ze swoim produktem jego charakterystykę techniczną, podając podstawowe parametry „operacyjne” dializatorów takie jak klirensy dla wzorcowych substancji (np. mocznika, kreatyniny, nieorganicznych fosforanów, witaminy B_{12} – dla standardowej wartości przepływu dializatu i wybranych wartości przepływu krwi $Q_B = 100, 200, 300$ i 400 ml/min) oraz wartość współczynnika ultrafiltracji (K_{ufr}) lub wartość ultrafiltracji dla zmieniającego się ciśnienia przezłonowego (TMP). Dodatkowymi informacjami, po które często sięgają lekarze, jest także powierzchnia dializatora oraz rodzaj błony dializacyjnej i jej grubość. Większość producentów podaje wartości K_D oznaczane w warunkach *in vitro* na podstawie pomiarów dokonywanych w roztworach wodnych, homogennych. Tylko nieliczne wyniki dotyczą pomiarów z wykorzystaniem krwi (np. bydlęcej) lub badań klinicznych. Z danych piśmiennictwa jednoznacznie wynika, że wyniki *in vitro* i *in vivo* cechuje około 10 - 13% rozbieżność. Wartości klirensów *in vivo* są mniejsze, gdyż w rzeczywistości są one klirensami całkowitej wody krwi. Stosowanie do wyliczenia dawki dializy wartości klirensu dializatora nie skorygowanej o wartość hematokrytu może być jedną z przyczyn zawyżenia tzw. dawki przepisanej dializy - a to prowadzi wprost do obniżenia skuteczności zabiegu.

Pomimo, iż od ponad ćwierć wieku staramy się wyliczać dawki dializy i indywidualizować terapię dzięki potężnemu narzędziu, jakim jest kinetyczne modelowanie dializoterapii - żaden z elementów tego procesu: wyliczanie klirensu dializatora, wyliczanie objętości dystrybucji toksyn mocznicowych albo jednoznaczne wskazanie na czas zabiegu (w skali jednorazowej sesji hemodializy jak i w skali tygodnia) nie okazał się satysfakcjonującym rozwiązaniem.

Lekarze generalnie zaakceptowali klirens dializatora ale tak naprawdę zależności pomiędzy K_D , Q_B , Q_D i KoA nie są wszystkim znane. Interpretacja koncepcji KoA – współczynnika przepuszczalności masowej dializatora oraz wykorzystanie tej wiedzy w doborze optymalnego dializatora lub przepływu krwi dla danego pacjenta, nie są powszechnie stosowane. Wartość KoA dializatora charakteryzuje jego zdolność do przepuszczania substancji rozpuszczonej i zmienia się odwrotnie proporcjonalnie do logarytmu masy cząsteczkowej tej substancji. Jako odrębny parametr - KoA nie ma zastosowania w dializoterapii lecz służy jedynie do precyzyjnego wyliczania wartości klirensu dializatora dla danej substancji, przy znanych przepływach krwi i dializatu [137]. Z praktycznego punktu widzenia wartość KoA od 30 do 300 ml/min charakteryzuje małe dializatory o optimum

oczyszczania przy przepływach krwi w granicach 30 - 70 ml/min. Dializatory o KoA od 300 do 600 ml/min zachowują liniową charakterystykę pracy w zakresie przepływu krwi od 50 do 150 ml/min, natomiast dializatory o KoA w przedziale 600 – 1000 ml/min i więcej – nawet do 250 ml/min [137].

Obliczanie objętości dystrybucji toksyn (V), która dla większości substancji rozpuszczalnych w wodzie jest równa całkowitej wodzie ustroju - w przypadku chorych dializowanych nastęca wiele trudności. Powodem jest albo nieprecyzyjność wzorów populacyjnych (np.: Watsona i wsp. lub tzw. "uproszczonej reguły": 55% - kobiety, 58% - mężczyźni [136]) albo mała powszechność metod impedancyjnych.

W badaniach nad skutecznością dostarczonej dawki dializy ze względów praktycznych musimy polegać na danych pośrednich - posługując się tzw. substancjami markerowymi [189]. Już od samego początku dializoterapii poszukiwano wskaźników skutecznego usuwania toksyn mocznicowych z ustroju [188]. Idealna substancja markerowa powinna spełniać następujące warunki: 1. powinna być zatrzymywana w ustroju w przebiegu niewydolności nerek; 2. eliminowana w trakcie dializy; 3. toksyczna; 4. generacja i eliminacja markera powinna być reprezentatywna dla innych (również toksycznych) związków; 5. jej stężenie powinno korelować z rokowaniem i stanem klinicznym chorych; oraz 6. być łatwo oznaczalna laboratoryjnie. Niestety, aktualnie nie dysponujemy markerem, który idealnie spełniałby wszystkie wyżej wymienione warunki [189].

Najczęściej stosowanym markerem związków niskocząsteczkowych rozpuszczalnych w wodzie o masie cząsteczkowej do 500 Da jest mocznik (60 Da). Powszechnie stosowany i uznany na całym świecie wskaźnik adekwatności dializy Kt/V wykorzystujący właśnie wartości klirensu mocznika, jest ściśle związany z odległym rokowaniem i przeżywalnością chorych dializowanych, co udowodniono w licznych randomizowanych badaniach i co nie podlega żadnym wątpliwościom [14, 129, 166]. Niemniej jednak należy mieć świadomość, że formułowanie oceny dotyczącej stopnia skuteczności oferowanej choremu dializy, opierającej się wyłącznie o monitorowanie eliminacji rozpuszczalnych w wodzie związków o niskiej masie cząsteczkowej nie jest postępowaniem właściwym, ponieważ odległe rokowanie chorych dializowanych uzależnione jest również od stopnia eliminacji tzw. średnich cząsteczek, czyli związków o masie cząsteczkowej powyżej 500 Da lub związków wiążących się z białkami surowicy. Toksyny średnicząsteczkowe stanowią „nieuchwytną” dla rutynowych oznaczeń laboratoryjnych grupę substancji, w związku z tym nie istnieje możliwość bezpośredniego monitorowania ich stężeń, co może stać się największym zagrożeniem dla chorych i pułapką dla leczących, przekonanych o skuteczności oferowanej

terapii. W związku z powyższym, w niniejszej pracy podjęto próbę mającą na celu jakościową i ilościową charakterystykę zachowania się wartości klirensów rzeczywistych substancji markerowych małych i średnich cząsteczek w warunkach klinicznych w stosowanych powszechnie w Polsce dializatorach niskoprzepływowych, wielokrotnie reutilizowanych kwasem nadctowym.

1.7. Powody, dla których reutilizuje się dializatory

Poważną przeszkodą na drodze poprawy skuteczności hemodializy pozostaje nadal niedoskonała w swej strukturze oraz funkcji błona półprzepuszczalna a także koszt tej terapii, nadal jeden z najwyższych we współczesnej medycynie. Dlatego też wszelkie działania zmierzające do racjonalizacji kosztów lub ich obniżenia są w skali lokalnej i globalnej absolutnym imperatywem dla leczących.

Reutilizacja dializatorów jest procedurą stosowaną niemal od początku wprowadzenia hemodializy. Stały postęp techniczny i produkcja nowych błon dializacyjnych doprowadziły do wyprodukowania dializatorów o lepszych parametrach i większej biogodności, niemniej w dalszym ciągu drogich. Ze względu na konieczność powtarzania zabiegów hemodializ, jednostkowy koszt dializatora ulega u każdego chorego wielokrotnemu pomnożeniu. Dlatego nawet niewielkie obniżenie kosztu pojedynczej hemodializy w skali oddziału, stacji a patrząc szerzej - w skali globalnej i po dłuższym okresie czasu - może przynieść bardzo duże oszczędności i w efekcie umożliwić leczenie hemodializami kolejnych chorych. Ma to szczególne znaczenie w krajach o słabszej kondycji ekonomicznej, w których wciąż brakuje środków dla zapewnienia leczenia nerkozastępczego wszystkim potrzebującym. Ze względu na niski koszt siły roboczej (wg własnych ocen około 15% ceny zabiegu, w USA 30 - 35%) cena dializatora w zależności od jego typu wynosi 25 - 40% kosztu całej procedury.

Raport Krajowego Koordynatora w Dziedzinie Nefrologii i Dializoterapii w Polsce z 2003 roku wskazuje, że w 39 / 191 stacji dializ reutilizuje się dializatory od 6 do kilkunastu razy, jednak w większości stacji ta procedura powtarzana jest 3 - 4 razy [142]. Obecnie większość ośrodków dializ w naszym kraju preferuje automatyczną reutilizację dializatorów przy użyciu urządzeń wykonujących samoczynnie większość etapów reutilizacji. Najczęściej do reutilizacji wykorzystuje się Renalinę®, która stanowi stabilizowany roztwór kwasu nadctowego (4,5%), kwasu octowego (6%) i nadtlenku wodoru (28%) [148].

1.8. Korzystne i niekorzystne aspekty reutilizacji

Problematyce wielokrotnego użycia dializatorów poświęcono wiele artykułów a nawet całych podręczników. Temat jest bowiem aktualny od lat 60. ubiegłego wieku i szeroko dyskutowany na łamach światowego piśmiennictwa.

Jeszcze do niedawna panował pogląd, że wielokrotne użycie dializatora nie powoduje żadnych negatywnych skutków, redukuje koszty leczenia – a dodatkowo może przynieść korzyści samym dializowanym. Argumentowano, że chorzy nie są narażeni na tzw. zespół pierwszego użycia dializatora, że wytwarzający się podczas dializy biofilm białkowy zwiększa biogodność błony dializacyjnej, że zmniejsza się narażenie chorego na działanie plastycyzatorów uwalniających się z nowych błon dializacyjnych oraz pozostałości innych substancji używanych w procesie produkcji dializatorów a także, że zwiększa się możliwość zastosowania lepszych (a zatem droższych) dializatorów bez podnoszenia kosztów leczenia.

Jako wady procesu reutilizacji wymieniano zwiększone ryzyko zakażeń wirusowych (chorych jak i personelu medycznego), ryzyko rozwoju reakcji pyrogennych oraz toksyczność związaną ze zwiększoną ekspozycją pacjentów na środki chemiczne stosowane w procesie reutilizacji. Nie eksponowano natomiast realnego ryzyka zmniejszenia skuteczności dializy po wielokrotnym użyciu danego filtra, skupiając się wyłącznie na monitorowaniu i przestrzeganiu wartości wskaźnika Kt/V mocznika [42, 126].

1.9. Niebezpieczeństwa i pułapki reutilizacji

W wyniku kontaktu krwi pacjenta z błoną dializacyjną na jej powierzchni oraz w obrębie kanałów dochodzi do adsorpcji białek osocza, co stwarza realne ryzyko zmniejszenia czynnej powierzchni błony dializacyjnej i zmianę charakterystyki dializatora.

Problem pogarszania się parametrów czynnościowych dializatora na skutek niepełnego usuwania biofilmu białkowego wytworzonego w czasie sesji hemodializy przez niektóre substancje stosowane w procesie reutilizacji początkowo próbowano ograniczyć do nadzorowania zachowania odpowiedniej objętości przedziału krwi kapilar dializatora (FBV), która gwarantowała odpowiedni klirens i Kt/V dla mocznika. Praktycznie nie zwracano uwagi na ryzyko zmniejszenia się klirensu związków średnio- i wysokocząsteczkowych wraz z kolejnymi krotnościami użycia danego filtra, między innymi z powodu braku łatwych i tanich w użyciu testów laboratoryjnych do oznaczania markerów tej grupy związków.

Jednak współczesna wiedza dotycząca kumulacji nieskutecznie usuwanych toksyn mocznicowych o większych cząsteczkach aniżeli masa cząsteczkowa najczęściej oznaczanego mocznika oraz substancji określanych mianem średnich cząsteczek, których kinetyka śróddializacyjna jest zupełnie różna od kinetyki mocznika - nieco inaczej nakazuje leczącym traktować problem reutilizacji. Wielokrotne stosowanie tego samego dializatora i reutilizowanie go substancją nie usuwającą w całości biofilmu białkowego (np.: kwasem nadoctowym) – może poważnie ograniczać i tak już początkowo niewielki klirens tych substancji, co zgodnie z aktualnym piśmiennictwem może być czynnikiem pogarszającym wskaźniki chorobowości i wyniki odległego rokowania hemodializowanych chorych.

1.10. Wprowadzenie do badań odpowiedzi interleukinowej w kontekście reutilizacji i badań AFM

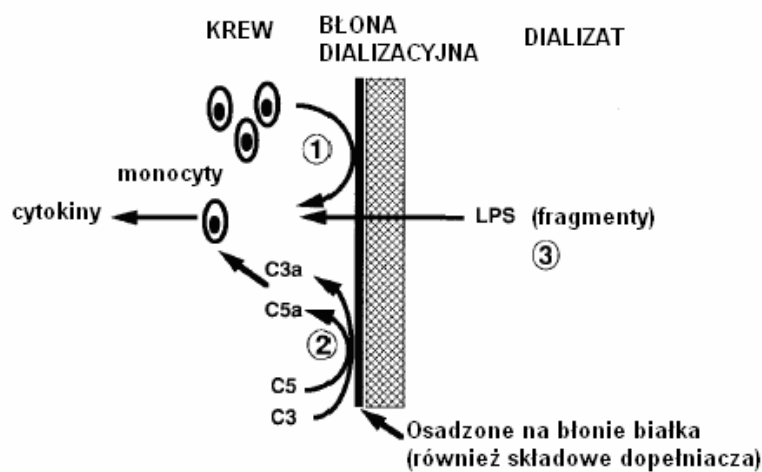
Rodzaj reakcji zachodzących w momencie kontaktu krwi pacjenta z kapilarą dializatora determinowany jest przez liczne właściwości samej błony. Skład chemiczny, szorstkość powierzchni oraz współczynniki przepuszczalności masowej i ultrafiltracji błony dializacyjnej są głównymi determinantami biozgodności oraz charakterystyki czynnościowej dializatora [20].

Kontakt krwi przewlekle hemodializowanych chorych z użyciem bioniezgodnych elementów krążenia pozaustrojowego prowadzi do uruchomienia szeregu swoistych i/lub nieswoistych reakcji ogólnoustrojowych, między innymi pobudzenia alternatywnej drogi układu dopełniacza oraz wydzielania przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC) licznych prozapalnych cytokin. Kontakt każdego obcego materiału z krwią prowadzi do aktywacji układu dopełniacza drogą alternatywną i powstania jego składowych: C3a, C3b i C5a oraz konwertaz C3 i C5. Zjawisko to zostało wykorzystane przez Craddocka i wsp. do oceny stopnia biozgodności błon dializacyjnych [1]. Stopień aktywacji dopełniacza podczas hemodializy zależy od powierzchni kontaktu oraz budowy chemicznej błony i jest zazwyczaj proporcjonalny do liczby grup hydroksylowych obecnych na jej powierzchni. Ponadto, aktywne frakcje dopełniacza - w tym terminalny kompleks aktywacji dopełniacza (TCC) - są w stanie stymulować ekspresję genów cytokin. Wysokie stężenie TCC jest bardzo silnym stymulatorem dla monocytów do produkcji TNF α oraz IL-6 [39, 54, 62, 109, 113].

W 1983 roku Henderson, Koch, Dinarello oraz Shaldon wysunęli tzw. hipotezę interleukinową, według której cytokiny powstające podczas zabiegu hemodializy są odpowiedzialne za niekorzystne objawy kliniczne występujące podczas zabiegu dializy.

Aktualnie jest coraz więcej dowodów na to, że cytokiny biorą udział zarówno w rozwoju ostrych jak i przewlekłych powikłań towarzyszących hemodializoterapii [3, 56].

Aktywacja monocytów i indukcja syntezy cytokin w czasie hemodializy zachodzić może na drodze trzech mechanizmów: 1) bezpośredniego kontaktu PBMC z błoną dializacyjną (w szczególności kontakt PBMC z resztami L-fukozy błon kuprofanowych); 2) powstania aktywnych składowych dopełniacza: C3a, C5a i C5-9 o działaniu chemotaktycznym i 3) obecności w dializacie substancji pochodzenia bakteryjnego (głównie LPS) przechodzących z płynu dializacyjnego do krwi w czasie tzw. odwróconej ultrafiltracji (p. ryc. 16) [54, 135].



Ryc. 16. Prawdopodobne mechanizmy zaangażowane w systemową odpowiedź zapalną (SIRS – *systemic inflammatory response*) na skutek kontaktu z błoną dializacyjną. Opis w tekście. Na podstawie [54] – przedruk za zgodą autorów.

Z ponad 20 cytokin produkowanych przez PBMC znaczenie w rozwoju objawów niepożądanych (stanowiących powikłanie hemodializoterapii) odgrywają szczególnie IL-1 β , IL-6, TNF α , które ściśle powiązane są z reakcjami biozgodności na kontakt krwi z błoną dializacyjną [39, 54, 62, 113]. Stężenie innego czułego markera stanu zapalnego – białka C reaktywnego (CRP) - ulega podwyższeniu dopiero po upływie 4 godzin po zadziałaniu czynnika wyzwalającego i utrzymuje się przez 24 do 72 godzin [130]. Dlatego też CRP nie może być wykorzystane jako swoisty, czuły i szybki marker wczesnej reakcji ustroju na obcą powierzchnię.

Wobec sprzecznych doniesień piśmiennictwa dotyczącego charakterystyki biozgodności poszczególnych typów błon dializacyjnych, do pełnej oceny biozgodności powinno się

stosować metody równoczesnej oceny zarówno charakterystyki samej błony jak i odpowiedzi pacjenta. W związku z powyższym, w niniejszej pracy badania nanostruktury kapilar techniką AFM zostały poszerzone o ocenę i porównanie stopnia biozgodności błon polisulfonowych i kuprofanowych metodą monitorowania zmian stężeń IL-6 oraz TNF α . Ponadto, podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy i w jakim stopniu reutilizacja kwasem nadoctowym wpływa na zmianę stopnia biozgodności celulozowych i syntetycznych błon dializacyjnych. W dostępnym piśmiennictwie nie znalazłam badania oceniającego stopień biozgodności błon dializacyjnych przy wykorzystaniu powyższych markerów w odniesieniu do krotności reutilizacji dializatorów oraz do struktury ich powierzchni. Moim dążeniem było wypełnienie tej luki, co precyzyjnie sformułowano w celach pracy.

1.11. Podsumowanie

Zgodnie z aktualnie obowiązującym stanowiskiem, jakkolwiek niepotwierdzonym we wszystkich badaniach, jedną z głównych korzyści reutilizacji dializatorów jest poprawa ich biozgodności. Innym problemem pozostaje związek kumulacji średnich cząsteczek wraz z narastającymi w czasie objawami klinicznymi, nie zawsze bezpośrednio kojarzonymi z toksemią mocznicową lub przyczynami zwiększonej chorobowości i śmiertelności chorych dializowanych. Przy bardzo złożonym obrazie klinicznym powikłań mocznicowych towarzyszących przewlekłej hemodializoterapii trudno o bezsporne dowody przemawiające za jednoznacznym związkiem pomiędzy reutilizacją, niedodializowaniem średnich cząsteczek a powikłaniami, chociaż jednoznacznie wskazano na proces reutilizacji jako przyczynę spadku klirensu rzeczywistego dializatorów.

Rozpatrując te zagadnienia powinniśmy przypomnieć sobie jeden z podstawowych wskaźników leżących u podstaw postępu współczesnej medycyny t.j. *risk to benefit ratio* - czyli: Czym ryzykujemy? Co zyskujemy? Innymi słowy - czy reutilizacja jest bezpiecznym dla chorych działaniem? Jeżeli tak, to ile razy można bezpiecznie użyć ten sam dializator i czy istnieją poparte wiarygodnymi i rzetelnymi danymi przesłanki do ograniczenia liczby reutilizacji? Czy i jak reutilizacja wpływa na klirensy rzeczywiste dializatora związków nisko- i średnicząsteczkowych? Czy rzeczywiście wielokrotne użycie dializatora poprawia biozgodność błon dializacyjnych? Czy można bezpiecznie (i bezkarnie) reutilizować dializatory wbrew ostrzeżeniom producentów, że są to urządzenia do jednokrotnego użycia?

Dysponując nowoczesnym narzędziem, jakim jest AFM, mogąc mierzyć wartości klirensów rzeczywistych związków nisko- i średnicząsteczkowych i posiadając możliwość oznaczania

stężenia markerów wczesnej odpowiedzi immunologicznej na kontakt krwi z błoną dializacyjną - wydało się celowe znalezienie odpowiedzi na przynajmniej niektóre z wyżej postawionych pytań, uznając za nadrzędny cel bezpieczeństwo zabiegu hemodializy i jej skuteczność.

W niniejszej pracy na podstawie uzyskanych wyników oraz na podstawie przeglądu światowego piśmiennictwa, dokonano wstępnej próby analizy problematyki bezpieczeństwa, etyki i jakości oferowanego leczenia nerkozastępczego oraz celowości wielokrotnego użycia dializatorów, mając na uwadze aktualne realia ekonomiczne.

2. CELE PRACY

Celem pracy było:

1. Porównanie struktury w skali nanometrów dwóch najczęściej stosowanych w hemodializoterapii typów błon dializacyjnych wykonanych z kuprofanu i polisulfonu oraz ocena zmian ich nanostruktury w zależności od krotności reutilizacji dializatora.
2. Ocena wpływu krotności reutilizacji na zachowanie się klirensu dializatora kuprofanowego i polisulfonowego, mierzonego wartością klirensu rzeczywistego związków niskocząsteczkowych (mocznika, kreatyniny, kwasu moczowego) oraz średnicząsteczkowych (kwasu foliowego, witaminy B₁₂).
3. Określenie optymalnej liczby reutilizacji dializatorów dla badanych typów błon.
4. Ocena i porównanie biozgodności błon kuprofanowych i polisulfonowych nowych i poddawanych wielokrotnej reutilizacji za pomocą oznaczania markerów biozgodności - IL-6 oraz TNF α .
5. Próba korelacji struktury błony dializacyjnej w skali nanometrów ze stężeniem markerów biozgodności: IL-6 oraz TNF α .

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. CZĘŚĆ KLINICZNA PRACY

3.1.1. Charakterystyka pacjentów

Badaniami objęto grupę 10 chorych w tym: 5 pacjentów (2 kobiety i 3 mężczyzn) leczonych hemodializami z powodu schyłkowej niewydolności nerek w Oddziale Dializ Kliniki Nefrologii Szpitala Uniwersyteckiego (ODKN SU) w Krakowie oraz 5 dzieci (3 dziewczynki i 2 chłopców) leczonych w Oddziale Dializ Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego (OD USD) w Krakowie.

Wiek chorych OD USD mieścił się w granicach od 15 do 20 lat (średnia wieku – 18 lat), natomiast chorych ODKN SU – od 46 do 63 lat (średnia wieku – 54,2 lat). Czas dializowania pacjentów OD USD w momencie rozpoczęcia badań wynosił od 5 do 123 miesięcy, (średnia - 53,2 miesiąca), natomiast pacjentów ODKN SU od 12 do 41 miesięcy (średnia – 27,2 miesiąca). Przyczyną schyłkowej niewydolności nerek wśród chorych OD USD u 3 badanych była nefropatia zaporowa, u 2 - ogniskowe szkliwiejące kłębuszkowe zapalenie nerek (FSGS), natomiast wśród pacjentów ODKN SU przewlekła nefropatia o nieustalonym podłożu była przyczyną PNN u 2 chorych, natomiast wielotorbielowatość nerek, wodonercze oraz obustronny rak nerki leżały u podłoża PNN u pozostałej trójki pacjentów.

Tab. 2. Skrócona charakterystyka pacjentów.

		Oddział Dializ Kliniki Nefrologii (ODKN SU)		Oddział Dializ Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego (OD USD)	
Wiek chorych		46 – 63 lat	średnia: 54,2 lat	15 - 20 lat	średnia: 18 lat
Czas leczenia HD		12 – 41 m-cy	średnia: 27,2 m-cy	5 – 123 m-cy	średnia: 53,2 m-cy
Rodzaj dostępu naczyniowego	przetoka naczyniowa	5		3	
	cewnik permanentny	0		2	
Przyczyna PNN		przewlekła nefropatia (przyczyna nieznana) – 2 wielotorbielowatość nerek – 1 wodonercze – 1 obustronny rak nerki – 1		nefropatia zaporowa – 3 FSGS – 2	

Wszyscy chorzy byli hemodializowani 3 razy w tygodniu, zgodnie z powszechnie przyjętym standardem hemodializoterapii - a czas dializy został wyznaczony indywidualnie na podstawie parametrów modelowania kinetycznego mocznika, jako tzw. czas przepisany dla założonej dawki dializy, opisaney wskaźnikiem Kt/V. W trakcie trwania badania wszystkie parametry sesji hemodializy (przepływ krwi - QB, przepływ dializatu - QD, czas hemodializy - td, oraz heparynizację) utrzymywano jako wartości stałe. Wartości nastawianej ultrafiltracji były każdorazowo uzależnione od aktualnego przyrostu masy ciała ponad ustaloną tzw. suchą masę ciała pacjenta.

3.1.2. Dostęp naczyniowy

Trzech pacjentów OD USD oraz wszyscy chorzy ODKN SU dializowani byli przy wykorzystaniu przetok tętniczo – żylnych wytworzonych na przedramieniu (*typ Cimino-Bresci*). U dwojga dzieci dostęp naczyniowy stanowił dwukanałowy cewnik typu *Perm – Cath* implantowany do żyły szyjnej wewnętrznej.

3.1.3. Dializatory

Do badań użyto dwóch, najczęściej wykorzystywanych w naszym kraju rodzajów błon dializacyjnych, wykonanych z kuprofanu i polisulfonu. Typy i parametry zastosowanych dializatorów przedstawiono w tabeli 3.

Chorzy ODKN SU dializowani byli przy użyciu niskoprzepływowych dializatorów polisulfonowych F7 i F8 firmy Fresenius. Chorzy OD USD dializowani byli przy użyciu dializatorów kuprofanowych NT 1375 firmy Bellco.

Przepływ krwi przez dializator (uzależniony od wydolności hemodynamicznej przetoki lub cewnika permanentnego) wynosił od 250 do 300 ml/min w dializatorach polisulfonowych i od 170 do 200 ml/min w dializatorach kuprofanowych. Chorych dializowano przy użyciu aparatów Dialog - Braun (OD USD) oraz Fresenius Medical Care 4008 B (ODKN SU). Przepływ dializatu we wszystkich aparatach wynosił standardowo 500 ml/min.

Tab. 3. Fabryczne parametry zastosowanych dializatorów (dane z internetowej bazy danych: www.membrana.com).

Typ dializatora (<i>low flux</i>)	Rodzaj błony	Metoda sterylizacji	Pow. błony (m ²)	FBV	Kufr	KoA mocznik	KoA kreatynina	KoA B12	KoA fosforany
Fresenius F7	PS	ETO	1,6	98	6,40	689	494	89	267
Fresenius F8	PS	ETO	1,8	110	7,50	731	530	105	298
Bellco NT 1375	CU	ETO	1,35	67	5,9	653	358	58	251

Tab. 4. Klirensy [ml/min] *in vitro* zastosowanych dializatorów (dane producenta).

Typ dializatora	Mocznik	Kreatynina	Fosforany	Witamina B ₁₂
Fresenius F7*	184 / 236	169 / 210	132 / 155	68 / 72
Fresenius F8*	186 / 240	172 / 216	138 / 165	76 / 82
Bellco NT 1375**	237	187	156	59

* - dane o skuteczności *in vitro* zostały określone przy: QB = 200 / 300 ml/min; QD = 500ml/min

** - dane o skuteczności *in vitro* zostały określone przy: QB = 300ml/min; QD = 500ml/min

Tab. 5. Wymiary włókien kapilar wykorzystanych w badaniu dializatorów.

Tworzywo błony dializacyjnej	Wewnętrzna średnica kapilary	Grubość ściany kapilary
Kuprofan	200 μm	7,5 μm
Polisulfon	200 μm	40 μm

3.1.3.1. Kwalifikacja dializatora do reutilizacji

W celu zapewnienia bezpieczeństwa dla zespołu opracowującego pozyskane po zabiegu hemodializy kapilary, do badania włączono chorych, którzy nie byli nosicielami wirusowego zapalenia wątroby typu B i C. Nie reutilizowano również dializatorów chorych będących w trakcie aktywnych zakażeń ogólnoustrojowych. Podczas automatycznej części reutilizacji wyznaczana była tzw. objętość po płukaniu (PPV) w nowych dializatorach równa objętości wiązki kapilar (FBV). W przypadku stwierdzenia wartości PPV poniżej 80% FBV, zgodnie z zaleceniami Gotch'a, dializator dyskwalifikowano od ponownego użycia [51]. Dializatory (zarówno kuprofanowe jak i polisulfonowe) reutilizowano automatycznie, przy użyciu maszyny Renatron RS 8300 (Renal Systems, Minneapolis, USA), zgodnie z wytycznymi producenta [149]. Do reutilizacji używano substancji Renalin® (Renal Systems, Minneapolis, USA) rozcieńczając stężony roztwór zgodnie z zaleceniem producenta [148]. Następnie dializatory zabezpieczano przed wyciekami Renaliny® zamykając porty odpowiedniki korkami i składowano w szafie ze stałym wyciągiem do czasu ponownego ich użycia lecz nie krócej aniżeli minimalny czas leżakowania zalecany przez producenta. Czystość wody użytej do płukania dializatorów kontrolowano przy pomocy testu LAL.

3.1.3.2. Przygotowanie dializatora do ponownego użycia

Przed rozpoczęciem kolejnej dializy Renalinę® wypłukiwano z dializatora przy użyciu 500 ml soli fizjologicznej a następnie wydializowywano w układzie zamkniętym, przy przepływie roztworu 200 ml/min, przepływie dializatu 500 ml/min, przy ujemnym ciśnieniu przezłonowym wynoszącym -200 mmHg, w ciągu 30 minut, sprawdzając jej obecność testem paskowym dostarczanym przez producenta. Przy ujemnym wyniku testu pacjent mógł bezpiecznie rozpoczynać dializę.

3.1.4. Antykoagulacja

W czasie zabiegu hemodializy krew pacjenta styka się bezpośrednio z powierzchnią obwodu pozaustrojowego krążenia. Kontakt ten aktywuje proces krzepnięcia krwi [41]. Aby zapewnić stałą drożność układu pozaustrojowego krążenia krwi w czasie hemodializy niezbędne jest podawanie antykoagulantów. Aktualnie powszechnie stosuje się heparynę drobnocząsteczkową, która stanowi wygodniejszą alternatywę dla heparyny frakcjonowanej, z

uwagi na brak konieczności monitorowania aktywowanego czasu krzepnięcia (ACT). Czterech pacjentów dializowanych przy użyciu dializatorów polisulfonowych otrzymywało heparynę drobnocząsteczkową, podawaną w dawce jednorazowej, na początku dializy. Wszystkich chorych dializowanych przy użyciu dializatorów kuprofanowych prowadzono na heparynie niefrakcjonowanej podawanej w postaci powtarzanych bolusów, pod kontrolą wartości ACT, które utrzymywano w granicach 180 – 200 sekund. Wyjątkiem był jeden pacjent dializowany na dializatorze polisulfonowym, który otrzymywał jedną dawkę heparyny niefrakcjonowanej na początku zabiegu a następnie ciągły wlew podczas trwania całej sesji hemodializy.

Decyzja o antykoagulacji chorych dializowanych na dializatorach kuprofanowych przy wykorzystaniu heparyny frakcjonowanej (zamiast łatwiejszej w użyciu heparyny drobnocząsteczkowej) wynikała z zaobserwowanego zjawiska nasilonego wykrzepniania krwi w kapilarach kuprofanowych podczas zabiegu hemodializy prowadzonym na heparynie drobnocząsteczkowej. Dializatory takie nie spełniały później wymogu odpowiedniej wartości PPV, niezbędnej aby dopuścić dializator do ponownego użytku.

3.1.5. Zgoda Komisji Bioetycznej

Przed rozpoczęciem badań sformułowano i przedłożono do Komisji Bioetycznej Collegium Medicum UJ wnioski o wyrażenie opinii dotyczącej przeprowadzenia niniejszego eksperymentu badawczego oraz zgody na jego wykonanie. Komisja dn. 19 grudnia 2002 roku wydała pozytywną decyzję nr KBET/337/B/2002.

Wszyscy chorzy (w przypadku dzieci także ich opiekunowie prawni) przed włączeniem do badania zgodnie z wytycznymi Komisji Bioetycznej zostali poproszeni o świadome wyrażenie zgody na uczestnictwo w programie poprzez podpisanie następujących dokumentów: „Informacji dla uczestnika badania” zawierającej szczegółowe dane o charakterze, celach i zasadach przeprowadzenia badania, „Formularza zgody uczestnika badania” oraz „Zgody na przetwarzanie danych osobowych”.

Badania nie stanowiły jakiegokolwiek ryzyka dla chorych, gdyż wszystkie dializatory będące przedmiotem badań zostały dopuszczone na terenie Rzeczypospolitej Polskiej do rutynowej dializy chorych z niewydolnością nerek i które, zgodnie z wytycznymi Krajowego Konsultanta ds. Nefrologii, mogły być reutilizowane. Dobór do programu badań chorych nie będących nosicielami wirusa zapalenia wątroby B i C zapewnił bezpieczeństwo zespołowi opracowującemu pozyskane po zabiegu hemodializy kapilary.

3.2. CZĘŚĆ POMIAROWA PRACY

3.2.1. BADANIE NANOSTRUKTURY POWIERZCHNI BŁON DIALIZACYJNYCH

Badaniom poddano kapilary dializatorów kuprofanowych i polisulfonowych pozyskane natychmiast po zabiegu hemodializy po danej, ustalonej wcześniej liczbie reutilizacji.

Kuprofanowe oraz polisulfonowe dializatory kapilarne po zakończonej sesji hemodializy płukano przez 15 - 20 minut wodą RO a następnie mechanicznie otwierano poprzez rozcięcie korpusu przy końcach obudowy. Do badania pobierano pęczki makroskopowo „czystych” kapilar, w których nie stwierdzano obecności skrzepów krwi. Te następnie umieszczano w pojemniku wypełnionym solą fizjologiczną oraz natychmiast dostarczano do pracowni AFM Instytutu Fizyki UJ w Krakowie.

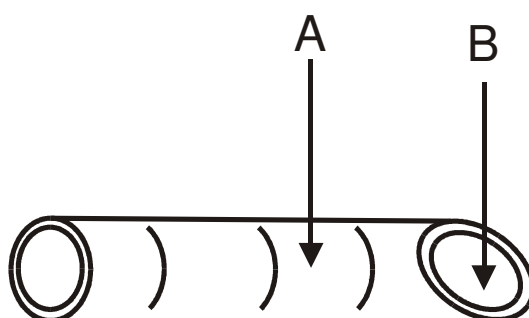
Ocenę zmian nanostruktury powierzchni błony kuprofanowej dokonywano poddając badaniom dializatory nowe oraz po 1, 2, 3, 4 i 5 - krotnej reutilizacji. Natomiast ocenę zmian nanostruktury powierzchni błony polisulfonowej dokonywano poddając badaniom dializatory nowe oraz po 1, 3, 5, 7 i 10 - krotnej reutilizacji. Do badań wykorzystano 60 dializatorów: 30 kuprofanowych i 30 polisulfonowych.

Do badania każdego dializatora losowo wybierano po 7 włókien, na których wykonywano 14 obrazów powierzchni (7 powierzchni wewnętrznej i 7 powierzchni zewnętrznej). Łącznie zgromadzono po 420 obrazów powierzchni (210 obrazów powierzchni wewnętrznej i 210 obrazów powierzchni zewnętrznej) zarówno kapilar kuprofanowych i polisulfonowych. Sumarycznie z mikroskopu AFM uzyskano 840 obrazów powierzchni kapilar, które zarchiwizowano w postaci plików graficznych jpg.

3.2.1.1. Metodologia badań nanostruktury błon dializacyjnych

Badanie zmian zachodzących w strukturze powierzchni błon dializacyjnych wykonywano przy wykorzystaniu techniki AFM, mikroskopem firmy Thermomicroscopes Autoprobe CP. Badania były wykonywane w powietrzu. Mokre włókna kapilar (szczególnie kapilar kuprofanowych) są bardzo elastyczne, zatem wykonywanie badań w trybie kontaktowym na takich preparatach nie byłoby możliwe, z uwagi na fakt, że wyniki tych pomiarów zawierałyby znaczną liczbę artefaktów, nie odzwierciedlając przy tym rzeczywistych zmian zachodzących na powierzchni obrazowanej próbki.

Przygotowanie kapilar do badania polegało na wyjęciu ich z roztworu soli fizjologicznej oraz wysuszeniu przez kilka do kilkunastu minut w powietrzu. Następnie, używając mikroskopu świetlnego (pod powiększeniem 50 – 100 x) lekko wilgotne włókna ścinano skalpelem pod ostrym kątem w taki sposób, aby można było uwidocznić powierzchnię wewnętrzną kapilary (ryc. 16.). W dalszej kolejności badane włókna przyklejano do wykonanej z metalu magnetycznej podkładki, za pomocą której preparat był umieszczany na stoliku skanera mikroskopu AFM.



Ryc. 16. Schemat ścięcia kapilary, celem udostępnienia jej powierzchni wewnętrznej dla ostrza mikroskopu. A – powierzchnia zewnętrzna kapilary; B – powierzchnia wewnętrzna kapilary.

3.2.1.2. Obrazowanie włókien kuprofanowych

Do badania każdej próbki wybierano losowo 7 włókien, które badano uzyskując łącznie 14 obrazów powierzchni (7 powierzchni wewnętrznej i 7 powierzchni zewnętrznej). Obrazy powierzchni zewnętrznej jak i wewnętrznej włókien kuprofanowych wykonywane były przy użyciu trybu kontaktowego.

Zarówno z powierzchni zewnętrznej jak i wewnętrznej błony uzyskiwano po 4 obrazy o wymiarach 5 x 5 μm oraz po 3 obrazy o wymiarach 2,5 x 2,5 μm . Każdy obraz składał się z 256 x 256 pikseli. Szybkość skanowania średnio wynosiła 1 Hz (1 linia / sekundę).

Taki sposób przeprowadzenia badań wynikał z własności błon dializacyjnych (rozmiar otworów w ściankach kapilar) oraz z charakterystyki samej techniki badawczej.

3.2.1.3. Obrazowanie włókien polisulfonowych

Do badania każdej próbki wybierano losowo 7 włókien, które badano uzyskując łącznie 14 obrazów powierzchni (7 powierzchni wewnętrznej i 7 powierzchni zewnętrznej). Obrazowanie powierzchni zewnętrznej błony polisulfonowej odbywało się w trybie bezkontaktowym, natomiast powierzchni wewnętrznej – w trybie kontaktowym.

Badanie zaprojektowano w ten sposób, aby zarówno z powierzchni zewnętrznej jak i wewnętrznej błony uzyskać 1 obraz o wymiarach 10 x 10 μm oraz 6 obrazów o wymiarach 5 x 5 μm . Każdy obraz składał się z 256 x 256 pikseli. Szybkość skanowania wynosiła średnio 1 Hz (1 linia / sek.).

3.2.1.4. Charakterystyka stosowanych ostrzy AFM

Do badania w trybie kontaktowym stosowano dźwignię (ultralever, firmy Veeco) wykonaną z azotku krzemu (Si_3N_4), której długość wynosiła 180 μm , szerokość 38 μm , grubość 1 μm , o stałej sprężystości 0,4 N/m, częstotliwości rezonansowej 45 kHz, piramidalnym kształcie ostrza oraz promieniu krzywizny około 20 nm.

Pracując w trybie bezkontaktowym używano dźwigni (ultralever, firmy Veeco) wykonanej z azotku krzemu (Si_3N_4), której długość wynosiła 180 μm , szerokość 38 μm , grubość 2 μm , o stałej sprężystości 3,2 N/m, oraz częstotliwości rezonansowej wynoszącej 90 kHz.

3.2.1.5. Przetwarzanie i analiza obrazów z mikroskopu sił atomowych do badania powierzchni błon dializacyjnych

3.2.1.5.1. Przetwarzanie wstępne

Zbadane mikroskopem AFM obrazy powierzchni zewnętrznych i wewnętrznych kapilar kuprofanowych i polisulfonowych zawierają informacje zarówno o kształcie powierzchni, jak i o szorstkości odpowiadającej lokalnej jej topografii. Kształt powierzchni widziany w skali całego skanowanego obrazu, a który jest kwadratowym wycinkiem wklęsłej (wewnętrznej) lub wypukłej (zewnętrznej) powierzchni kapilary, zdeformowany jest dodatkowo procesem przygotowawczym, składającym się z ukośnego przecięcia z

następowym przymocowaniem jej do podłoża, co pozwalało stabilnie i wygodnie badać próbkę w mikroskopie.

Zakłócenia, które w istotny sposób wpływają na wartości parametrów szorstkości powierzchni (RMS, BR 20%, BR 80%) uniemożliwiają ich wiarygodny i dokładny pomiar, spowodowane są licznymi artefaktami (bruzdy, zanieczyszczenia powierzchni kapilar kryształami soli fizjologicznej) oraz walcowatym kształtem powierzchni kapilary - będącej wycinkiem mikrorurki. Widoczna na większości obrazów zmiana kształtu powierzchni ze zmianą wartości Z kolejnych linii obrazu wyniknęła ze sposobu pracy ostrza mikroskopu. Walcowaty kształt powierzchni próbki powodował dodanie do każdego jej punktu pewnej składowej szorstkości, wyrażonej wartością odchyłki średniokwadratowej (RMS), równej odchyleniu w tym punkcie powierzchni od płaszczyzny \bar{z} . Mniej istotnym zakłóceniem była zmiana średniej wartości \bar{z} w kolejnych cyklach skanowania.

Obrazy AFM, aby mogły zostać poddane pomiarom porównawczym zostały przetworzone cyfrowo. Zastosowano do tego, między innymi, technikę redukcji rozdzielczości metodą interpolacji najbliższego sąsiada (NS, liniową) oraz technikę aproksymacji tła wielomianem pierwszego stopnia [157].

3.2.1.5.2. Analizowane parametry szorstkości powierzchni

Badanie charakterystycznych cech błon dializacyjnych z wykorzystaniem mikroskopu AFM polega w znacznej mierze na wyliczaniu i porównywaniu wartości określonych parametrów opisujących właściwości powierzchni zarejestrowanej w postaci obrazu AFM [157]. Poniżej przedstawiono wykorzystane parametry: odchylenie RMS odpowiadające szorstkości powierzchni oraz BR – proporcję pokrycia.

3.2.1.5.2.1. Odchylenie RMS

Odchylenie RMS odpowiada wartości odchylenia standardowego (czyli miary zmienności wokół średniej) obliczonego dla wartości Z (wysokości) w obrębie badanego obszaru powierzchni.

Odchylenie RMS – jest pierwiastkiem z sumy kwadratów odchyleń od średniej arytmetycznej \bar{z} podzielonej przez liczbę stopni swobody ($n - 1$). Odchylenie od średniej jest różnicą pomiędzy poszczególnymi obserwacjami z_i a średnią \bar{z} .

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (z_i - \bar{z})^2}$$

gdzie:

z_i – wynik i-tej obserwacji w próbie

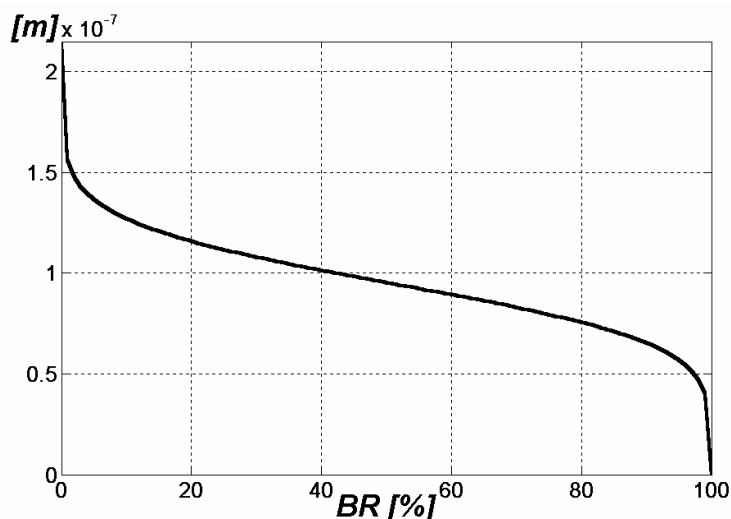
\bar{z} – średnia arytmetyczna wyznaczona na podstawie próby

n – liczba wykonanych obserwacji

$n - 1$ – liczba stopni swobody (liczba niezależnych obserwacji, których można użyć do obliczenia danej charakterystyki)

3.2.1.5.2.2. Amplituda w funkcji *bearing ratio*

Proporcja pokrycia (BR - *bearing ratio*) z podaniem liczby procentowej punktów (BR 20%, BR 80%) oznacza znalezienie takiej wartości zmiennej z (wysokość nad płaszczyzną wyznaczaną przez osie x i y trójwymiarowej przestrzeni), dla której podany procent ogólnej liczby punktów obrazu AFM ma wartość większą od tej wartości lub jej równą. Zmieniając wartość progu od 0% do 100% otrzymuje się wykres amplitud odpowiadających procentowemu progowi BR (ryc. 17.). Zazwyczaj wystarczające jest podanie jedynie wybranych wartości – np. dla BR o wartościach 20% i 80%.



Ryc.17. Przykład wykresu amplitudy w funkcji *bearing ratio*.

3.2.1.5.2.3. Współczynnik zmienności oraz wskaźniki dynamiki zmian

Do szczegółowej oceny zmienności szorstkości powierzchni badanych błon wykorzystano współczynnik zmienności oraz wskaźniki dynamiki zmian:

a) Współczynnik zmienności - stosunek odchylenia standardowego parametru szorstkości (RMS, BR 20%, BR 80%) do jego średniej arytmetycznej.

$$V\% = (SD / \text{średnia arytmetyczna}) \times 100\%$$

b) Wskaźniki dynamiki zmian:

- przyrost absolutny – różnica pomiędzy wartością RMS obserwowaną w kolejnych reutilizacjach a wartością RMS obserwowaną dla nowej błony. $PA = R - N$.
- tempo zmian - stosunek przyrostu absolutnego dla RMS obserwowanego po kolejnych reutilizacjach do wartości obserwowanej dla nowej błony. $T\% = PA/N \times 100\%$.
- jednopodstawowy wskaźnik zmian - stosunek wartości RMS obserwowanych po kolejnych regeneracjach do wartości obserwowanych dla nowej błony. $JWZ\% = R/N \times 100\%$.

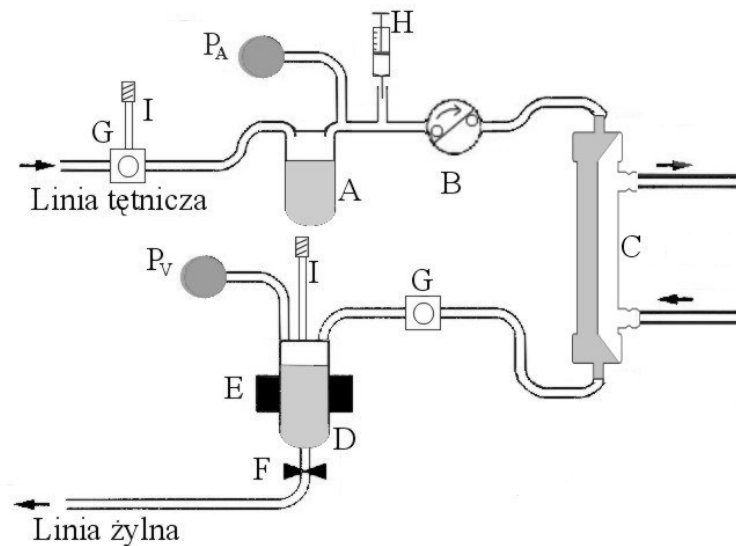
3.2.2. OCENA WPŁYWU REUTYLIZACJI NA KLIRENS WYBRANYCH TOKSYN MOCZNICOWYCH

Na podstawie wykonanych wcześniej pomiarów klirensów rzeczywistych trzech modelowanych toksyn mocznicowych (mocznika, kreatyniny i kwasu moczowego) ocenianych podczas 21 sesji hemodializacyjnych u 6 chorych – określono optymalny czas dokonywania pomiaru wartości współczynników przepuszczalności masowej dla dializatorów polisulfonowych, dokonując pomiarów co 10 minut [205]. Średnia arytmetyczna wartości KoA dla wybranych markerów była najbardziej zbliżona do wartości KoA obliczonej dla ich klirensów rzeczywistych w 90. minucie trwania dializy [206, 207]. Pomiary klirensu rzeczywistego dializatorów przeprowadzono w niniejszej pracy dokładnie w tym czasie.

3.2.2.1. Pomiar klirensu rzeczywistego dializatora

Pobór krwi do badań przed i za dializatorem odbywał się przez nakłucie specjalnych okienek w linii tętniczej i żylniej układu poza pacjentem (ryc. 18.). W 90. minucie hemodializy dwie osoby jednocześnie pobierały po około 4 ml krwi z linii tętniczej i żylniej układu. W tym celu posługiwano się jednorazowymi probówkami typu SARSTEDT Monovette® o odpowiedniej objętości. Krew wirowano 30 minut z prędkością 3000

obrotów/minutę. Następnie surowicę odciągano do 5 ml probówek, które opisywano imieniem i nazwiskiem pacjenta, krotnością reutilizacji oraz datą pobrania krwi. Surowicę przechowywano w temperaturze -20°C lub niższej.



Ryc. 18. Schemat krążenia pozaustrojowego w przebiegu hemodializy. A–tętniczy zbiornik wyrównawczy, B-pompa krwi (rolkowa), C-Dializator, D-żylny zbiornik wyrównawczy, E-ultradźwiękowy detektor powietrza, F-zamek z zaciskiem detektora, G-porty z okienkiem do pobierania krwi, H-pompa infuzyjna heparynowa, I-porty infuzyjne. Przedruk za zgodą autorów [137].

Wpływ krotności reutilizacji na zachowanie się klirensu rzeczywistego dializatora kuprofanowego oceniano poddając badaniom dializatory nowe oraz po 1, 2, 3, 4 i 5 - krotnej reutilizacji. Wpływ krotności reutilizacji na zachowanie się klirensu rzeczywistego dializatora polisulfonowego oceniano poddając badaniom dializatory nowe oraz po 1, 3, 5, 7 i 10 - krotnej reutilizacji.

W niniejszej pracy, do obliczenia klirensu rzeczywistego dializatora zarówno markerów związków niskocząsteczkowych oraz markerów związków średnicząsteczkowych wykorzystano równanie: $KD = QB [(C_{bi} - C_{bo})] / C_{bi} + (QF C_{bo} / C_{bi})$, jakkolwiek w codziennej praktyce klinicznej często pomija się zjawisko ultrafiltracji ponieważ wywiera ono jedynie 1 – 3% wpływ na zwiększenie klirensu w klasycznej hemodializie przy wykorzystaniu błon *low – flux* [125].

Wyliczone rzeczywiste klirensy związków markerowych dały podstawę do obliczeń współczynnika przepuszczalności masowej dializatora (KoA) dla każdej z wymienionych

substancji, podczas kolejnych krotności użycia danego typu dializatora. Wartości współczynnika przepuszczalności masowej dializatora obliczano przy pomocy licencjonowanego programu NEPHRON 97 w oparciu o wzór:

$$KoA = [QD \cdot QB / QD - QB] \cdot \ln [1 - KD / QD] / [1 - KD / QB].$$

3.2.2.2. Oznaczenia laboratoryjne markerów toksemii mocznicowej

W niniejszej pracy obliczano wartości klirensów rzeczywistych nisko- i średniocząsteczkowych substancji markerowych. Jako modelowych substancji niskocząsteczkowych użyto: mocznika (60 Da), kreatyniny (113 Da) oraz kwasu moczowego (168 Da), natomiast jako markerami związków średniocząsteczkowych posłużono się kwasem foliowym (441 Da) oraz witaminą B₁₂ (1355 Da).

3.2.2.2.1. Oznaczenia stężenia mocznika, kreatyniny oraz kwasu moczowego

Do oznaczeń związków będących niskocząsteczkowymi markerami toksemii mocznicowej posłużono się kolorymetrycznymi testami slajdowymi Kodak Ektachem Clinical Chemistry Slides dla mocznika (BUN/UREA), kreatyniny (CREA) i kwasu moczowego (URIC ACID) firmy Kodak Clinical Products, USA. Analizator Kodak Ektachem 700, przed badaniami wykonanymi w jednym cyklu, został skalibrowany wg zaleceń kontroli jakości (QC).

Określono współczynniki zmienności (mocznik, kreatynina, kwas moczowy, poziom normalny, poziom wysoki). Odczyt i zapis wyników odbywał się automatycznie.

Przed wykonywaniem oznaczeń przestrzegano zasady jednokrotnego rozmrażania próbek surowic oraz stopniowego rozmrażania surowic przechowywanych w temperaturze -70°C poprzez doprowadzenie materiału najpierw do -20°C , a następnie do $+4^{\circ}\text{C}$ i temperatury pokojowej [172].

3.2.2.2. Oznaczenia stężenia kwasu foliowego i witaminy B₁₂

Pomiarów stężenia kwasu foliowego i witaminy B₁₂ dokonano metodą radioimmunologiczną (RIA) przy użyciu gotowego zestawu Dualcount Solid Phase No Boil Assay For Vitamin B12 / Folic Acid, firmy Diagnostic Product Corporation, USA [40]. Z uwagi na fakt, że stężenie kwasu foliowego we wszystkich badanych próbkach przekraczało zakres pomiarowy - surowice przed oznaczaniem rozcieńczano kalibratorem zerowym. Parametry zestawu dla kwasu foliowego: Zakres pomiarowy wynosił 0,5 – 24 ng/ml, przy czułości metody: 0,3 ng/ml. Precyzja metody wewnątrz zestawu - CV wynosiła średnio 4,0%, precyzja metody między zestawami wynosiła średnio 6,1%, liniowość metody wynosiła średnio 5,1% [40]. Parametry zestawu dla witaminy B₁₂: Zakres pomiarowy wynosił 50 - 2400 pg/ml, przy czułości metody 34 pg/ml. Precyzja metody wewnątrz zestawu - CV wynosiła średnio 4,4%, precyzja metody między zestawami wynosiła średnio 5,8%, liniowość metody wynosiła średnio 4,3% [40]. Pomiarów radioaktywności dokonywano w automatycznym liczniku scyntylicyjnym promieniowania gamma Wallac 1470 WIZARD®, firmy PerkinElmer, USA. Czas pomiaru wynosił 1 minutę, a błąd zliczeń był < 1%.

3.2.3. METODOLOGIA OCENY BIOZGODNOŚCI BADANYCH BŁON DIALIZACYJNYCH

Oceny stopnia biozgodności błon kuprofanowych i polisulfonowych dokonano poprzez monitorowanie stężeń interleukiny 6 (IL-6) oraz czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF α) w surowicy chorych w czasie sesji hemodializ, wykorzystując w tym celu wyniki wcześniejszych badań.

W eksperymentalnym badaniu przeprowadzonym w warunkach *in vivo*, w którym oceniano kinetykę procesu wydzielania cytokin po zadziałaniu na organizm ludzki bakteryjnym lipopolisachrydem (LPS) - stwierdzono, że maksymalne stężenie IL-6 zostaje osiągnięte w 120 minutach, natomiast maksymalne stężenie TNF α – stwierdzono pomiędzy 60 a 90 minutą od momentu podania pacjentowi tej substancji [160].

W niniejszej pracy od pacjentów pobierano około 1,5 ml krwi (w celu oznaczenia zarówno stężeń TNF α i IL-6) przed rozpoczęciem sesji HD a następnie taką samą ilość krwi pobierano po 90 minutach w celu oznaczenia stężenia TNF α i po 120 minutach w celu oznaczenia stężenia IL-6. Wówczas krew pobierano przed dializatorem. Dalsza procedura zabezpieczenia materiału była identyczna jak w przypadku badań klirensów.

3.2.3.1. Oznaczenia laboratoryjne markerów biozgodności

Oznaczanie stężenia interleukiny 6

Stężenia IL-6 oznaczano metodą immunoradiometryczną (IRMA), przy użyciu gotowego zestawu Interleukin-6-IRMA (Immunoradiometric Assay), firmy Biosource International [9]. Parametry zestawu Interleukin-6-IRMA Biosource International: precyzja metody wewnątrz zestawu CV: 5,4%, pomiędzy zestawami: 5,2%, czułość metody: 6 pg/ml [9]. Pomiarów radioaktywności dokonywano w automatycznym liczniku scyntylicyjnym promieniowania gamma Wallac 1470 WIZARD®, firmy PerkinElmer, USA. Czas pomiaru wynosił 1 minutę, a błąd zliczeń był < 1%.

Oznaczanie stężenia TNF α

Stężenia TNF α oznaczano metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu gotowego zestawu Tumor Necrosis- α CB ELISA (TNF α CB), firmy Biosource International [10]. Parametry zestawu Tumor Necrosis- α CB ELISA, Biosource International: precyzja metody wewnątrz zestawu: CV \leq 5,0%, pomiędzy zestawami: \leq 5,0%, czułość metody: 2 pg/ml [10]. Pomiarów absorbancji próbek dokonywano metodą jednofalową przy użyciu filtra 650 nm w automatycznym czytniku mikroplitek Universal Microplate Reader El_x800_{NB} firmy BIO-TEK Instruments, INC.

Wszystkie omówione wyżej oznaczenia wykonano w Zakładzie Biochemii Klinicznej Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie.

3.3. ANALIZA STATYSTYCZNA – OPRACOWANIE UZYSKANYCH WYNIKÓW

Wszystkie obliczenia statystyczne zamieszczone w niniejszej pracy wykonano przy wykorzystaniu programu StatsDirect Statistical Software wersja 2.3.8 (numer licencji: m1640s824653qk18hd529511a).

3.3.1. Analiza statystyczna wyników pomiarów szorstkości powierzchni błon dializacyjnych

Wyniki parametrów szorstkości powierzchni dla dwóch badanych grup dializatorów: kuprofanowych i polisulfonowych poddano analizie testem t-Studenta dla małych prób z uwzględnieniem równości wariancji.

Wyniki badań szorstkości powierzchni błon dializacyjnych przedstawiono głównie w formie graficznej. Wykresy prezentują wartości pomiarowe, średnie, współczynniki zmienności oraz wskaźniki dynamiki zmian po kolejnych reutilizacjach dializatorów.

3.3.2. Analiza statystyczna wyników klirensów rzeczywistych dializatora

Średnie wartości klirensów rzeczywistych po kolejnych reutilizacjach dializatora porównywano z wartościami średnimi klirensów rzeczywistych dla nowej błony danego typu dializatora przy pomocy testu t-Studenta dla małych prób z uwzględnieniem równości wariancji.

W celu zobrazowania zmienności obserwowanych wyników - rezultaty badania przedstawiono graficznie w formie wykresów zawierających wartości średnie klirensów rzeczywistych oraz współczynników przepuszczalności masowej dializatora oraz ich odchylenia standardowe.

3.3.3. Analiza statystyczna wyników oceny biozgodności błon dializacyjnych

Zmiany wartości stężeń IL-6 i TNF α w trakcie dializy na nowym oraz 1, 2, 3, 4, 5 - krotnie reutilizowanym dializatorze kuprofanowym a także na nowym oraz 1, 3, 5, 7, 10 - krotnie reutilizowanym dializatorze polisulfonowym analizowano testem t-Studenta dla małych prób w badaniach zależnych.

Istotność statystyczną zmian wartości stężeń IL-6 oraz TNF α po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatora kuprofanowego oraz polisulfonowego w czasie t_0 i t_{120} (dla IL-6) oraz w czasie t_0 i t_{90} (dla TNF α) względem stężeń tych cytokin stwierdzanych dla nowych błon analizowano testem t-Studenta dla badań zależnych w małych próbach.

Istotność statystyczną zmian stężeń IL-6 oraz TNF α (Δ IL-6; Δ TNF α) po kolejnych reutilizacjach dializatora kuprofanowego oraz polisulfonowego względem zmiany stężenia odpowiednio IL-6 i TNF α dla nowych błon analizowano testem Wilcoxon dla zmiennych zależnych z uwzględnieniem małej liczebności grupy.

Porównanie średniej wartości stężenia IL-6 oraz TNF α uzyskanych w grupie kontrolnej z profilami wydzielania odpowiednio IL-6 (w czasie t_0 i t_{120}) i TNF α (w czasie t_0 i t_{90}) po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatorów kuprofanowych i polisulfonowych analizowano testem t-Studenta dla małych prób z uwzględnieniem równości wariancji.

Istotność statystyczną różnic w wartościach średnich IL-6 oraz TNF α uzyskanych w czasie t_0 i t_{120} (dla IL-6) oraz w czasie t_0 i t_{90} (dla TNF α) w obydwu grupach pacjentów (dializowanych przy użyciu błon kuprofanowych oraz polisulfonowych) pomiędzy badanymi grupami analizowano testem t-Studenta dla grup niezależnych.

Zestawienie parametrów szorstkości powierzchni wewnętrznej błony kuprofanowej i polisulfonowej z wartościami stężeń IL-6 oraz TNF α w kolejnych użyciach dializatorów przedstawiono w postaci współczynników korelacji liniowej Persony.

Za poziom istotności we wszystkich obliczeniach przyjęto $p < 0,05$.

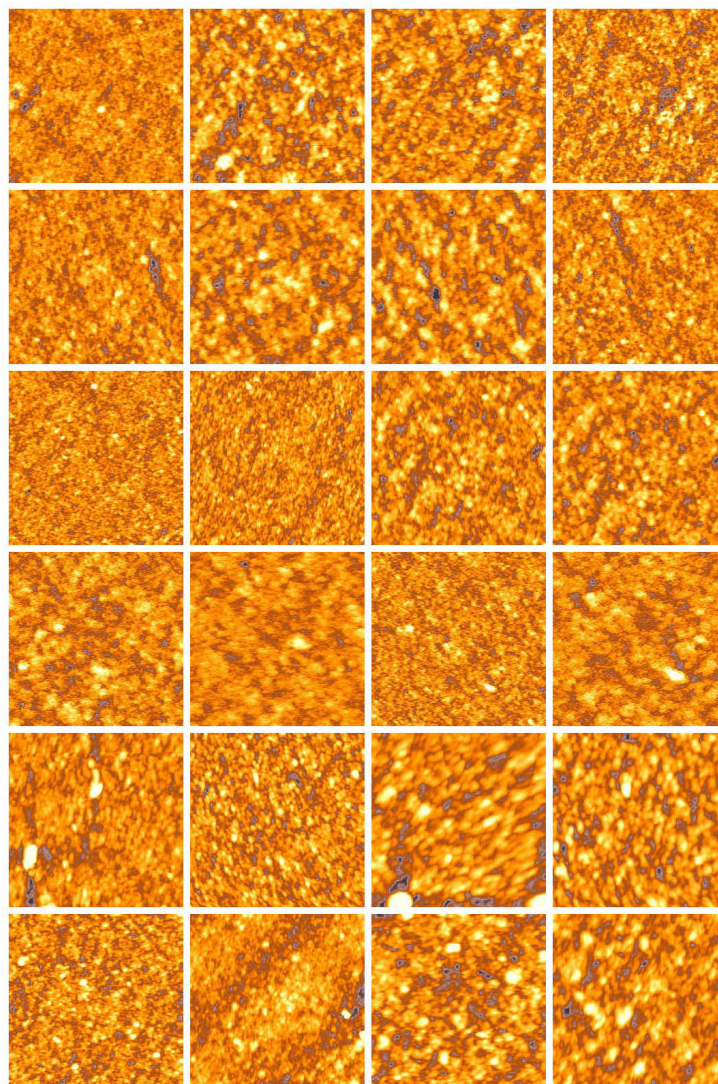
4. WYNIKI

4.1. WYNIKI POMIARÓW SZORSTKOŚCI POWIERZCHNI BŁON DIALIZACYJNYCH

4.1.1. Obrazy AFM powierzchni błon kuprofanowych i polisulfonowych

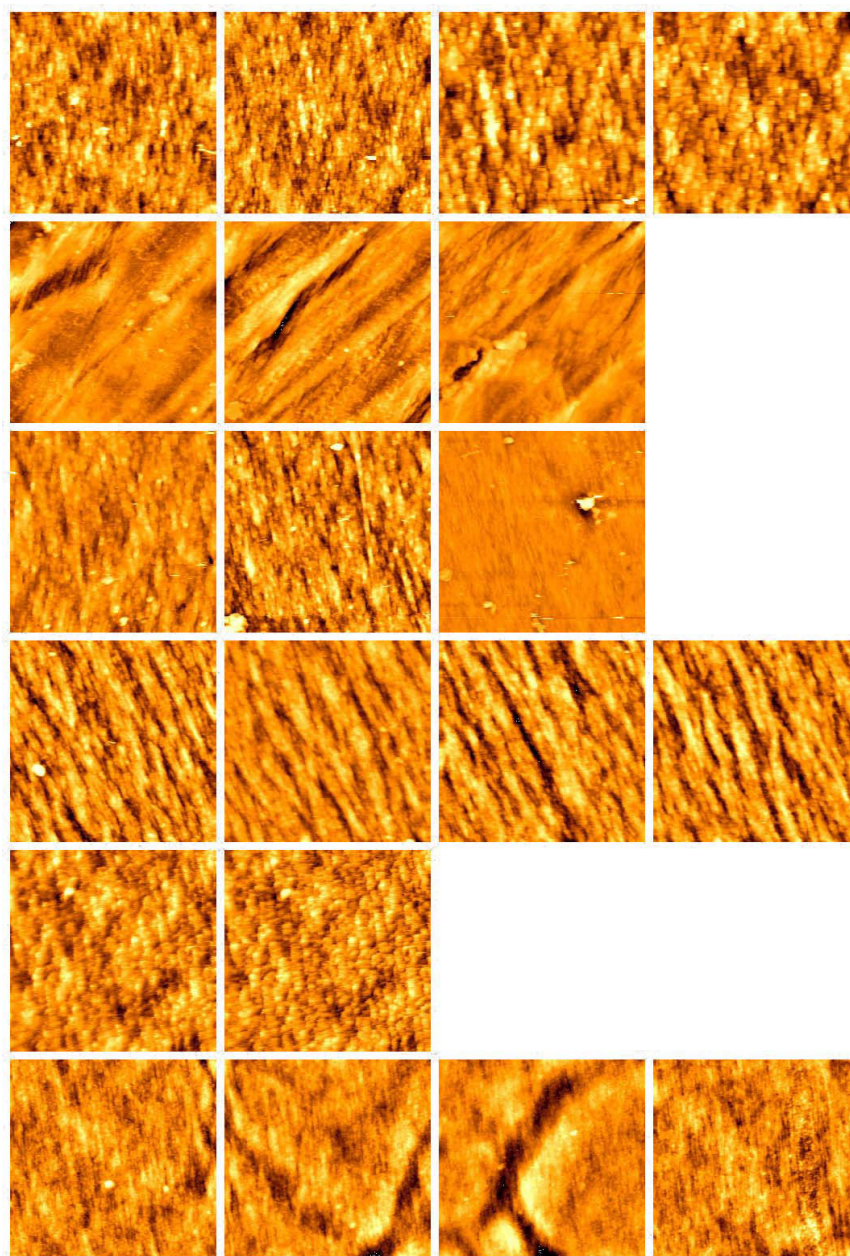
Na rycinach 19 – 22 przedstawiono wybrane obrazy powierzchni wewnętrznych i zewnętrznych kapilar badanych dializatorów uzyskanych z AFM. Szczegółowe opisy zamieszczono pod rycinami.

4.1.1.1. Obrazy AFM powierzchni wewnętrznych błon kuprofanowych – po redukcji tła



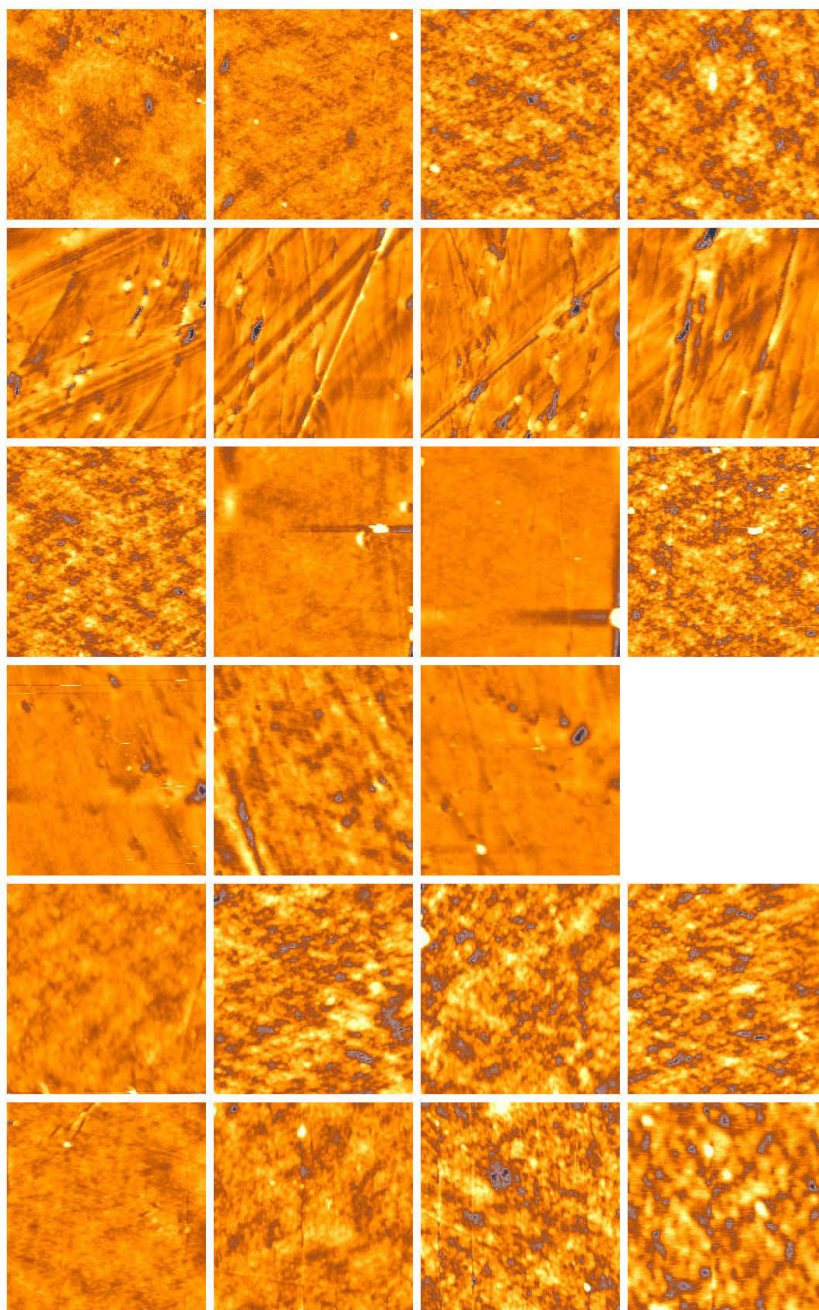
Ryc. 19. Zestawienie wybranych obrazów AFM powierzchni wewnętrznych błon kuprofanowych po (w wierszach od góry) 0, 1, 2, 3, 4, 5 – reutilizacji.

4.1.1.2. Obrazy AFM powierzchni wewnętrznych błon polisulfonowych – po redukcji tła



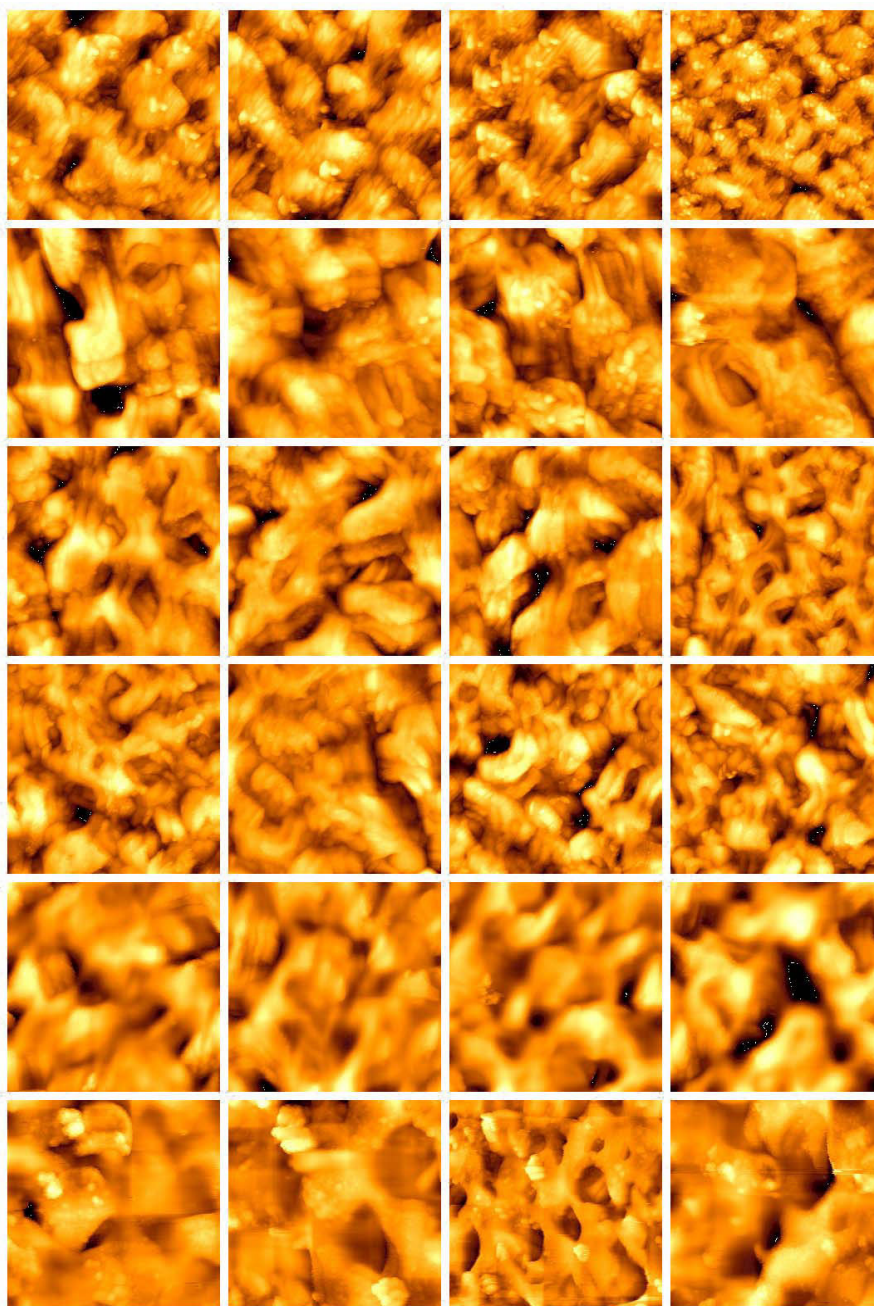
Ryc. 20. Zestawienie wybranych obrazów AFM powierzchni wewnętrznych błon polisulfonowych po (w wierszach od góry) 0, 1, 3, 5, 7 i 10 – reutilizacji.

4.1.1.3. Obrazy AFM powierzchni zewnętrznych błon kuprofanowych – po redukcji tła



Ryc. 21. Zestawienie wybranych obrazów AFM powierzchni zewnętrznych błon kuprofanowych po (w wierszach od góry) 0, 1, 2, 3, 4, 5 – reutilizacji.

4.1.1.4. Obrazy AFM powierzchni zewnętrznych błon polisulfonowych – po redukcji tła



Ryc. 22. Zestawienie wybranych obrazów AFM powierzchni zewnętrznych błon polisulfonowych po (w wierszach od góry) 0, 1, 3, 5, 7 i 10 – reutilizacji.

4.1.2. Parametry szorstkości powierzchni: RMS, BR 20%, BR 80% oraz współczynnik zmienności (V%)

Pierwszym z ocenianych parametrów powierzchni była odchyłka średniokwadratowa (RMS) współrzędnej Z dla każdego punktu od wartości średniej \bar{z} (obrazy AFM są odwzorowaniem trójwymiarowej powierzchni wycinka błony dializacyjnej). Wartość RMS odpowiada wartości odchylenia standardowego obliczonego dla wartości Z (wysokości) w obrębie badanego obszaru powierzchni. Wraz ze wzrostem SD wartości zmiennej losowej odchylają się od średniej, co jest równoznaczne ze wzrostem szorstkości powierzchni.

Drugim ocenianym parametrem jest współczynnik BR (*bearing ratio* – proporcja pokrycia), z podaniem procentowej liczby punktów (BR 20%, BR 80%).

Wartości parametrów RMS, BR 20%, BR 80% oraz współczynnika zmienności przedstawiono w tabelach 6 i 7.

Tab. 6. Błona kuprofanowa. Parametry szorstkości powierzchni wewnętrznej i zewnętrznej oraz współczynnik zmienności (V%).

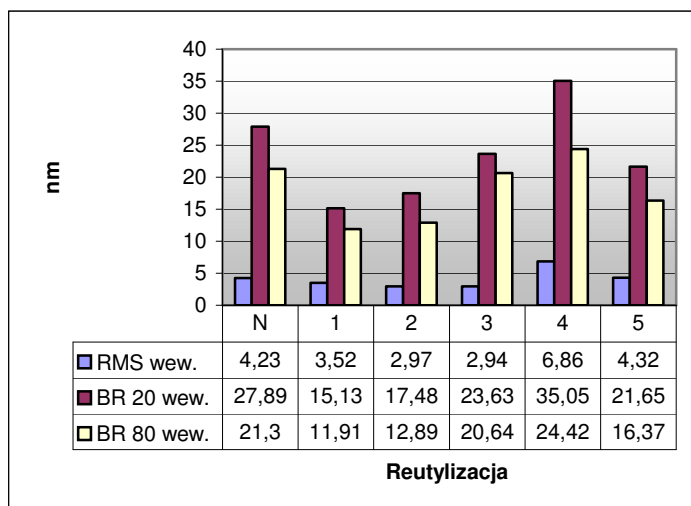
Błona Kuprofanowa	Badanie	Powierzchnia wewnętrzna			Powierzchnia zewnętrzna		
		$x \pm SD$	min-max	V %	$x \pm SD$	min-max	V %
RMS	N	4,23 ± 4,71	1,14 - 12,5	111	2,04 ± 0,55	1,48 - 2,72	27
	1	3,52 ± 0,77	2,43 - 4,12	22	5,38 ± 3,09	1,78 - 8,92	57
	2	2,97 ± 0,32	2,76 - 3,53	11	2,34 ± 0,36	2,03 - 2,91	15
	3	2,94 ± 0,71	2,16 - 3,97	24	3,6 ± 1,04	2,45 - 5,2	29
	4	6,86 ± 8,73	2,38 - 22,46	112	3,89 ± 2,22	1,15 - 7,64	57
	5	4,32 ± 1,87	2,72 - 7,48	43	3,06 ± 0,97	1,79 - 4,36	32
BR 20%	N	27,89 ± 39,47	5,76 - 98,14	141	14,45 ± 3,91	10,02 - 19,49	27
	1	15,13 ± 7,76	2,09 - 22,9	51	44,96 ± 30,83	8,85 - 79,27	68
	2	17,48 ± 7,18	13,75 - 30,31	41	14,83 ± 3,97	10,06 - 19,23	27
	3	23,63 ± 20,38	11,58 - 59,71	86	19,82 ± 8,06	11,31 - 32,26	41
	4	35,05 ± 42,22	12,51 - 110,4	120	19,55 ± 8,2	11,29 - 31,23	42
	5	21,65 ± 9,63	13,91 - 37,48	44	20,8 ± 8,89	11,73 - 31,45	43
BR 80%	N	21,3 ± 32,54	3,92 - 79,33	125	11,32 ± 3,51	7,6 - 16,56	31
	1	11,91 ± 3,32	8,03 - 17,18	28	22,79 ± 20,87	5,88 - 53,55	92
	2	12,89 ± 7,41	9,35 - 26,15	57	9,66 ± 2,7	6,64 - 14,03	28
	3	20,64 ± 23,14	8,01 - 61,77	112	17,12 ± 9,29	7,33 - 29,41	54
	4	24,42 ± 27,68	8,23 - 73,58	113	12,24 ± 4,54	7,42 - 18,66	37
	5	16,37 ± 8,98	8,82 - 30,44	55	16,59 ± 8,42	8,85 - 27,78	51

Tab. 7. Błona polisulfonowa. Parametry szorstkości powierzchni wewnętrznej i zewnętrznej oraz współczynnik zmienności (V%).

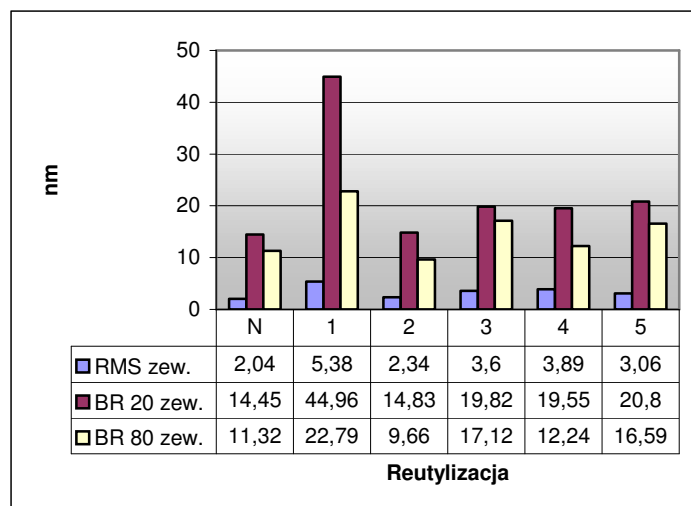
Błona Polisulfonowa	Badanie	Powierzchnia wewnętrzna			Powierzchnia zewnętrzna		
		X ± SD	min-max	V %	X ± SD	min-max	V %
RMS	N	7,26 ± 2,17	4,65 - 10,6	30	29,38 ± 3,8	24,54 - 33,64	13
	1	9,84 ± 4,36	6,41 - 17,28	44	48,25 ± 24,46	31,46 - 91,32	50
	3	7,93 ± 2,26	5,22 - 10,18	28	39,48 ± 7,18	32,77 - 50,93	18
	5	8,08 ± 2,34	4,21 - 9,86	29	33,02 ± 8,41	24,77 - 46,3	25
	7	10,69 ± 6,2	5,27 - 20,21	58	31,28 ± 7,17	22,53 - 37,16	23
	10	8,42 ± 3,02	4,45 - 12,46	36	39,28 ± 8,29	32,37 - 53,18	21
BR 20%	N	34,54 ± 10,86	20,46 - 50,39	31	114,6 ± 25,36	121,9 - 185	17
	1	54,4 ± 24,98	35,99 - 96,86	46	260,14 ± 134,47	150,8 - 492,6	52
	3	37,77 ± 13,8	24,08 - 57,81	36	222,1 ± 83,78	154,2 - 356,6	38
	5	40,56 ± 12,74	20,73 - 50,8	31	207,98 ± 68,67	126 - 289,9	33
	7	56,55 ± 32,41	25,13 - 95,71	57	169,22 ± 57,65	108,4 - 243,9	34
	10	45,25 ± 19,53	22,96 - 71,34	43	232,76 ± 67,53	169,3 - 335,2	29
BR 80%	N	22,96 ± 8,11	12,86 - 33,8	35	94,21 ± 23,94	73,75 - 133,1	25
	1	36,16 ± 12,95	25,39 - 56,11	36	187,9 ± 104,7	91,73 - 365,8	56
	3	25,88 ± 10,8	15,46 - 42,66	42	154,58 ± 79,63	82,72 - 282,4	51
	5	27,95 ± 9,22	14,36 - 35,21	33	155,31 ± 57,25	83,76 - 228,5	37
	7	39,2 ± 23,38	16,33 - 67,64	59	121,52 ± 54,57	66,17 - 189,8	44
	10	30,86 ± 13,48	16,01 - 45,91	43	163,04 ± 49,27	109,4 - 238,5	30

4.1.3. Graficzne przedstawienie wyników badania nanostruktury powierzchni błon dializacyjnych techniką AFM

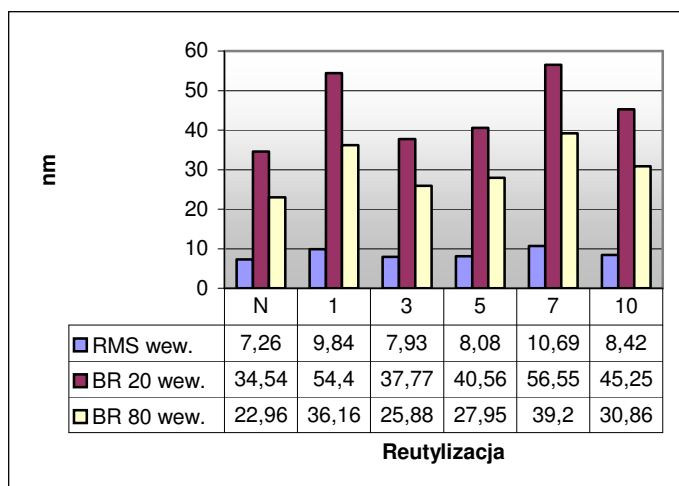
4.1.3.1. Parametry szorstkości: RMS, BR 20%, BR 80%



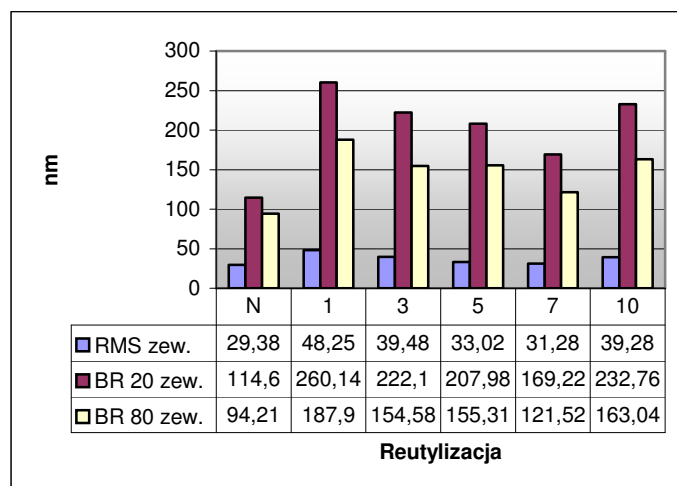
Ryc. 23. Kuprofan - średnie wartości: RMS, BR 20%, BR 80% – powierzchnia wewnętrzna.



Ryc. 24. Kuprofan - średnie wartości: RMS, BR 20%, BR 80% – powierzchnia zewnętrzna.

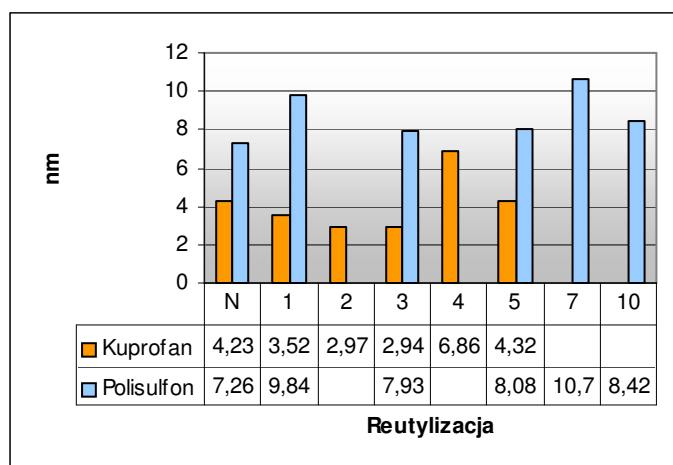


Ryc. 25. Polisulfon - średnie wartości: RMS, BR 20%, BR 80% – powierzchnia wewnętrzna.

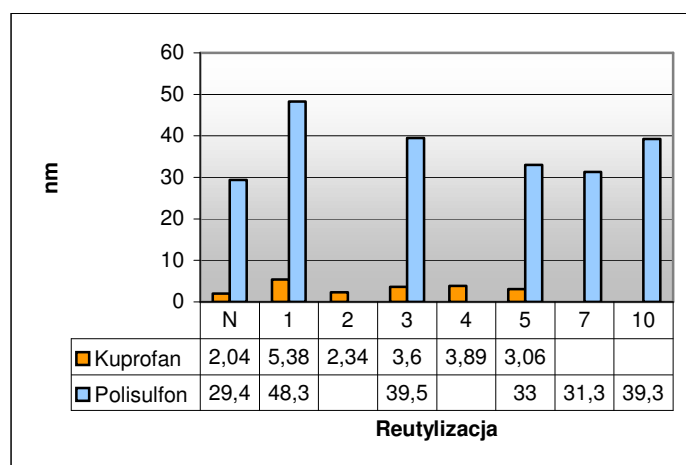


Ryc. 26. Polisulfon - średnie wartości: RMS, BR 20%, BR 80% – powierzchnia zewnętrzna.

Analizując ryciny 23, 24, 25, 26 – przedstawiające średnie wartości RMS, BR 20% oraz BR 80% powierzchni wewnętrznych i zewnętrznych błon kuprofanowych oraz polisulfonowych - poza znacznym rozrzutem wyników i po odrzuceniu wartości skrajnych – widoczny jest brak istotnych zmian szorstkości powierzchni obydwu badanych błon w odniesieniu do kolejnych krotności reutilizacji oraz bardzo ścisła korelacja wszystkich trzech mierzonych parametrów (RMS, BR 20% i BR 80%). Przyczynę tego zjawiska szczegółowo omówiono w dyskusji.



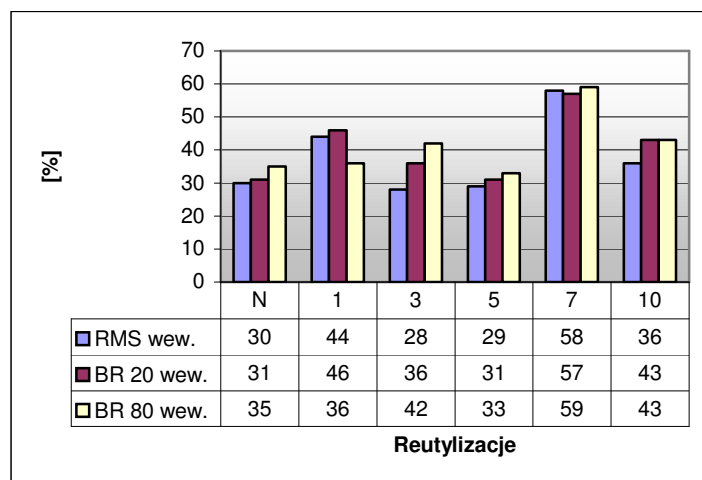
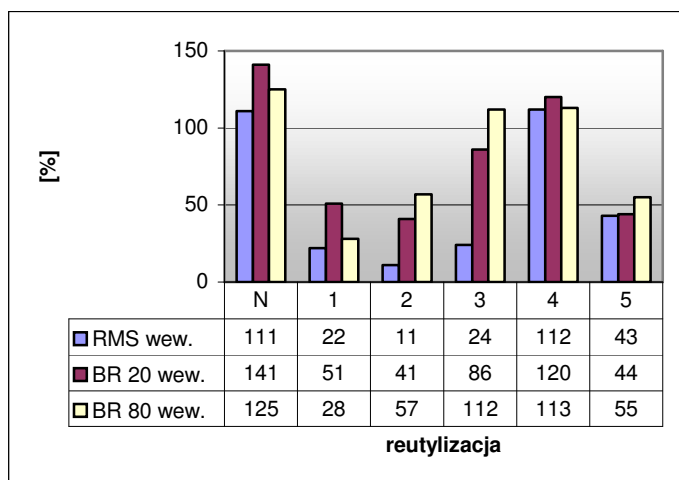
Ryc. 27. Kuprofan i polisulfon - zestawienie średnich wartości RMS powierzchni wewnętrznych.



Ryc. 28. Kuprofan i polisulfon - zestawienie średnich wartości RMS powierzchni zewnętrznych.

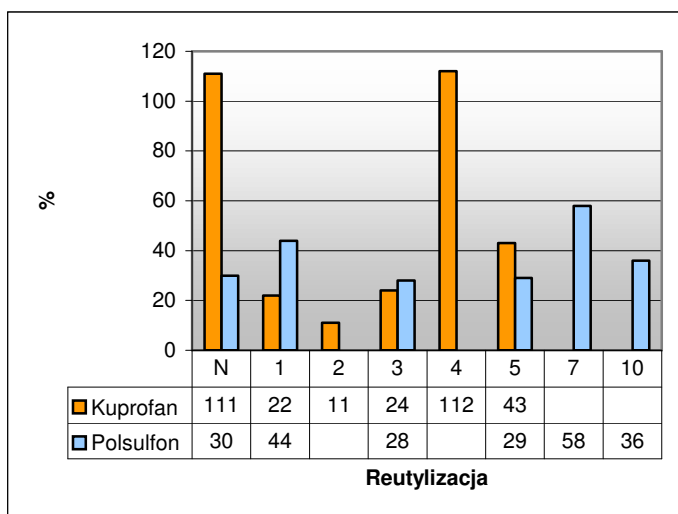
Parametry szorstkości powierzchni wewnętrznej błony polisulfonowej (średnia wartość RMS: 8,7 nm) przedstawione na ryc. 27 wskazują na większą szorstkość tej powierzchni w porównaniu do powierzchni wewnętrznej błony kuprofanowej (średnia wartość RMS: 4,1 nm). Analizując wartości parametrów szorstkości powierzchni zewnętrznej błon kuprofanowych i polisulfonowych przedstawionych na ryc. 28 można zauważyć znacznie większą szorstkość (czyli porowatość) błony polisulfonowej (średnia wartość RMS powierzchni zewnętrznej: 36,8 nm) w porównaniu do błony kuprofanowej (średnia wartość RMS powierzchni zewnętrznej: 3,4 nm).

4.1.3.2. Współczynnik zmienności (V%)

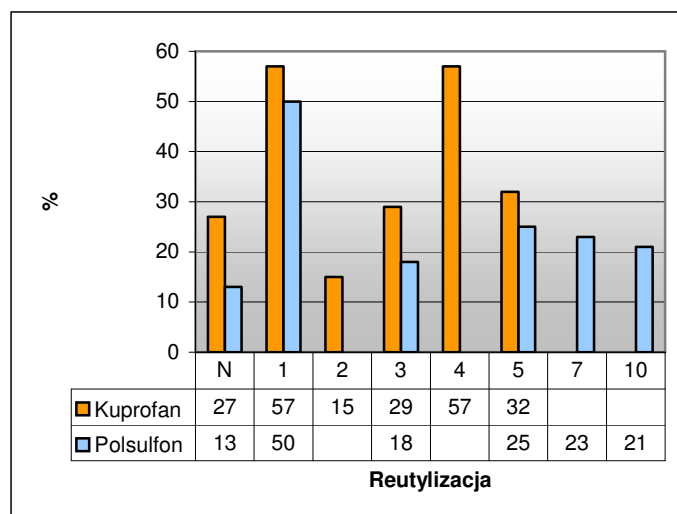


Ryc. 29. Kuprofan - V% dla RMS, BR 20%, BR 80% - powierzchnia wewnętrzna. Ryc. 30. Polisulfon - V% dla RMS, BR 20%, BR 80% - powierzchnia wewnętrzna.

Średnia wartość RMS powierzchni wewnętrznej nowej błony kuprofanowej wynosiła 4,2 nm, przy czym zakres zmieniał się od 1,1 do 12,5 nm (tab. 6). Jest to bardzo wysokie zróżnicowanie parametrów początkowych RMS powierzchni wewnętrznej tej błony, której współczynnik zmienności (V%) wynosił aż 111%. Po kolejnych reutilizacjach parametr RMS powierzchni wewnętrznej błony kuprofanowej zachowywał się bardzo niestabilnie – co znalazło odzwierciedlenie we współczynniku zmienności, który po kolejnych 5 reutilizacjach kształtował się od 11% do 112% (ryc. 29.) Konsekwencje tego zjawiska szczegółowo omówiono w dyskusji. Wartości RMS powierzchni wewnętrznej nowej błony polisulfonowej (tab. 7.) są stabilne, przyjmując wartości od 4,6 do 10,6 nm. Wyliczona wartość współczynnika zmienności V% dla tej błony wynosiła 30%. Największy, obserwowany współczynnik zmienności RMS powierzchni wewnętrznej błony polisulfonowej wynosił 58%; najmniejszy - 28% (ryc. 30). Konsekwencje tego zjawiska szczegółowo omówiono w dyskusji.



Ryc. 31. Zestawienie V% dla RMS dla błon kuprofanowych i polisulfonowych – powierzchnie wewnętrzne.



Ryc. 32. Zestawienie V% dla RMS dla błon kuprofanowych i polisulfonowych – powierzchnie zewnętrzne.

Dane przedstawione na rycinach 31 i 32 wskazują, że średnia wartość współczynnika zmienności V% dla RMS powierzchni wewnętrznej błony polisulfonowej wynosiła 37,5%, natomiast średnia wartość współczynnika zmienności V% dla RMS powierzchni wewnętrznej błony kuprofanowej wynosiła aż 53,8%. Podobnie kształtowały się wartości współczynnika zmienności dla RMS powierzchni zewnętrznych badanych błon. Średnia wartość współczynnika zmienności V% dla RMS powierzchni zewnętrznej błony polisulfonowej wynosiła 25%, natomiast średnia wartość współczynnika zmienności V% dla RMS powierzchni zewnętrznej błony kuprofanowej wynosiła aż 36,2% (tab. 8.)

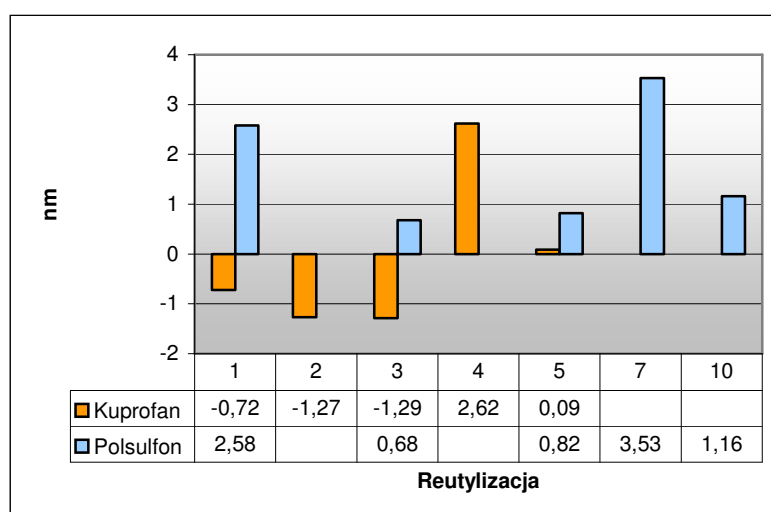
Tab. 8. Zestawienie średnich wartości parametrów szorstkości powierzchni (RMS, BR 20%, BR 80%) i współczynnika zmienności (V%) dla RMS błon polisulfonowych i kuprofanowych.

	Błona kuprofanowa				Błona polisulfonowa			
	RMS	BR 20%	BR 80%	V% RMS	RMS	BR 20%	BR 80%	V% RMS
pow.wew.	4,1	23,5	17,9	53,8%	8,7	44,9	30,5	37,5%
pow.zew.	3,4	22,4	15	36,2%	36,8	201,1	146,1	25%

4.1.3.3. Wskaźniki dynamiki zmian

W celu przeanalizowania wskaźników dynamiki zmian badanych błon kuprofanowych i polisulfonowych po kolejnych krotnościach reutilizacji - posłużono się wskaźnikami dynamiki zmian parametrów szorstkości po analizowanych krotnościach reutilizacji dializatorów, obliczanymi w stosunku do parametrów szorstkości nowych błon.

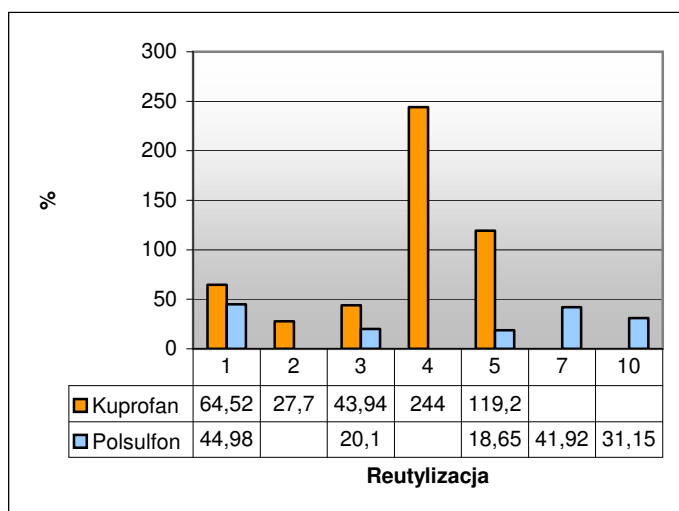
4.1.3.3.1. Przyrost absolutny (PA) dla RMS powierzchni wewnętrznych błon kuprofanowych i polisulfonowych



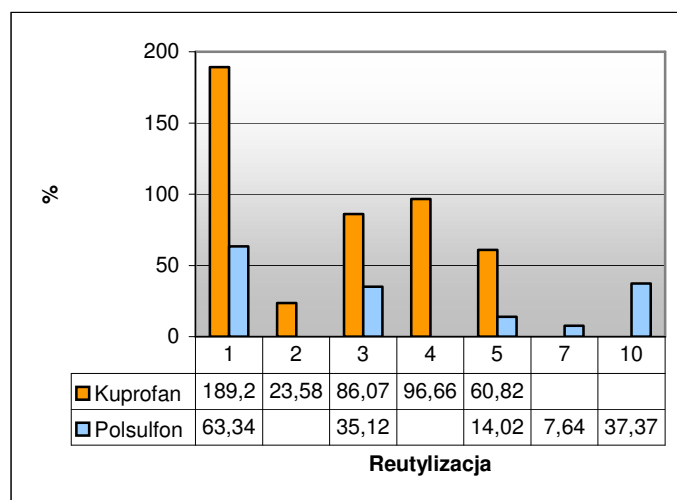
Ryc. 33. PA dla RMS powierzchni wewnętrznych błon kuprofanowych i polisulfonowych.

Wartości przyrostu absolutnego dla RMS powierzchni wewnętrznej błony kuprofanowej przedstawione na rycinie 33 wskazują na początkowe, nieznaczne zmniejszanie się tego parametru po procesie reutilizacji - a następnie na jego dość gwałtowny wzrost. Nie można było jednak zaobserwować żadnego trendu w zachowaniu się tego parametru. Przyrost absolutny po każdej kolejnej reutilizacji błon polisulfonowych był dodatni, jednakże również i w tym przypadku nie można było zaobserwować żadnego trendu w zachowaniu się tego parametru.

4.1.3.3.2. Tempo zmian (T%) dla RMS powierzchni wewnętrznych i zewnętrznych błon kuprofanowych i polisulfonowych



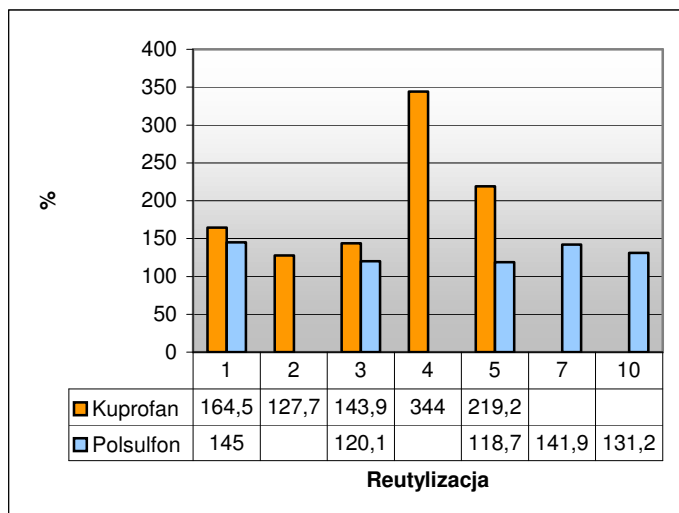
Ryc. 34. T% dla RMS kuprofanu i polisulfonu – powierzchnia wewnętrzna.



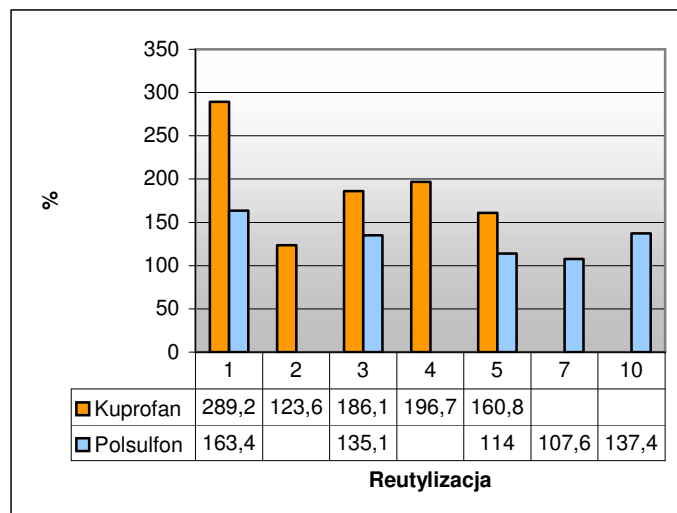
Ryc. 35. T% dla RMS kuprofanu i polisulfonu - powierzchnia zewnętrzna.

Dane zawarte na rycinach 34 i 35 wskazują, że wartości tempa zmian (T%) po kolejnych reutilizacjach dla wszystkich obserwowanych parametrów szorstkości (RMS, BR20% i BR 80%) w przypadku błony polisulfonowej były stabilne i przewidywalne (średnia wartość T% dla RMS powierzchni wewnętrznej – 31,4%, dla powierzchni zewnętrznej – 31,5%) – co potwierdza dużą odporność polimeru polisulfonowego na czynniki zewnętrzne, związane z użytkowaniem tego typu dializatorów. Natomiast w przypadku błony kuprofanowej parametr tempa zmian był zmienny, niestabilny i po kolejnych regeneracjach charakteryzował się dużymi wzrostami i spadkami (średnia wartość T% dla RMS powierzchni wewnętrznej – 99,9%, dla powierzchni zewnętrznej – 91,3%), co świadczy o braku trwałości celulozy i odporności tego tworzywa na czynniki związane z klinicznym użytkowaniem i procesem reutilizacji tego typu dializatorów.

4.1.3.3.3. Jednospodstawowy wskaźnik zmian (JWZ%) dla RMS powierzchni wewnętrznych i zewnętrznych błon kuprofanowych i polisulfonowych



Ryc. 36. JWZ % dla RMS kuprofanu i polisulfonu - powierzchnia wewnętrzna.



Ryc. 37. JWZ % dla RMS kuprofanu i polisulfonu - powierzchnia zewnętrzna.

Porównanie wartości jednospodstawowego wskaźnika zmian (JWZ%) w stosunku do wartości obserwowanych dla nowej błony również potwierdza fakt dużej stabilności, jednorodności i przewidywalności parametrów szorstkości powierzchni błony polisulfonowej (średnia wartość JWZ% dla RMS powierzchni wewnętrznej – 131,4%, dla powierzchni zewnętrznej – 131,5%) oraz o braku tych cech w przypadku błony kuprofanowej (średnia wartość JWZ% dla RMS powierzchni wewnętrznej – 199,9%; dla powierzchni zewnętrznej – 191,3%), co zobrazowano na rycinach 36 i 37.

4.2. WYNIKI POMIARÓW KLIRENSÓW RZECZYWISTYCH DIALIZATORA

4.2.1. Wartości klirensu rzeczywistego (K_D) i współczynnika przepuszczalności masowej (K_{oA}) dla markerów niskocząsteczkowych: mocznika, kreatyniny i kwasu moczowego

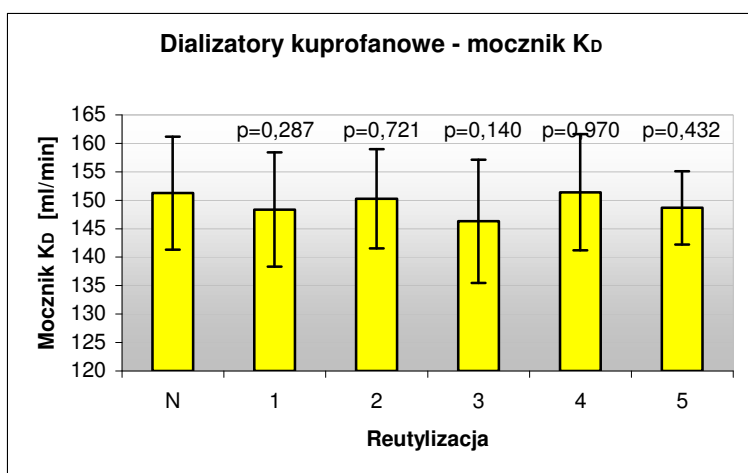
W celu zobrazowania zmienności obserwowanych wyników przedstawiono je zarówno w tabelach jak i graficznie (w formie wykresów zawierających wartości średnie klirensów rzeczywistych oraz współczynników przepuszczalności masowej dializatora wraz z odchyleniami standardowymi).

Przedstawione w tabelach 9 - 16 wartości klirensów rzeczywistych badanych dializatorów wszystkich substancji wzorcowych wyliczono z ich stężeń we krwi, z uwzględnieniem zjawiska ultrafiltracji.

4.2.1.1. Dializatory kuprofanowe

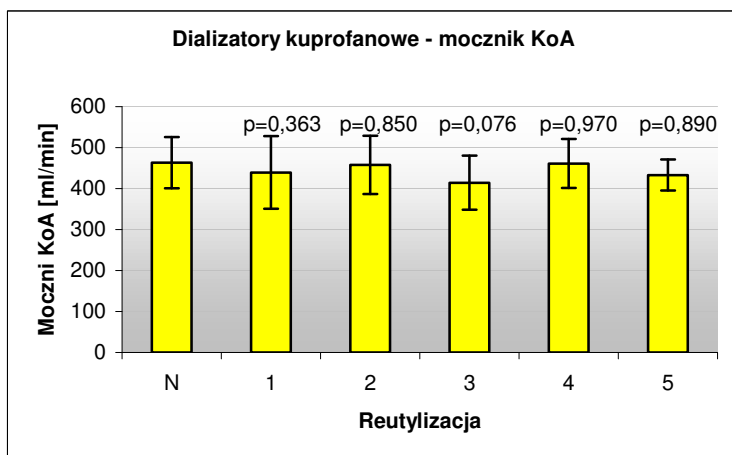
Tab. 9. Dializatory kuprofanowe: wartości K_D i KoA dla nowych dializatorów oraz po kolejnych reutilizacjach.

Pacjent	N		1		2		3		4		5	
	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA
1	142,2	561,83	140,5	520,59	141,2	536,58	138,3	477,26	133,8	410,18	138	472,02
2	150,2	461,79	154,5	521,67	151,9	483,66	149,3	451,01	156,2	550,33	149	447,52
3	145,1	406,49	138,3	349,19	152,2	487,75	145	405,53	152	485,02	149	447,52
4	167,8	472,49	166,7	462,39	163	430,95	163,1	431,76	159,6	405	154,6	370,96
5	151	412,34	141,8	342,17	143	350,2	135,8	305,81	155,4	455,05	152,7	427,96



	N	1	2	3	4	5
K_D	151,26	148,36	150,26	146,3	151,4	148,66
SD	9,93	10,04	8,71	10,81	10,2	6,43

Ryc. 38. Średnie wartości K_D wraz z SD dla mocznika po kolejnych reutilizacjach dializatorów kuprofanowych.

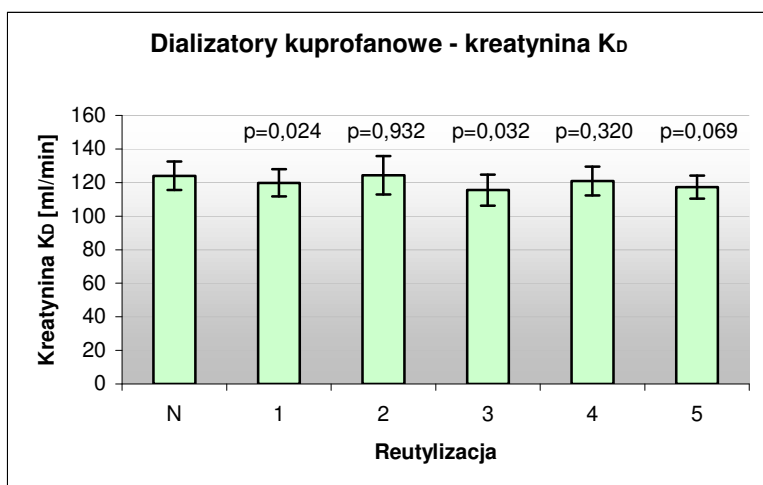


	N	1	2	3	4	5
KoA	462,99	439,2	457,83	414,27	461,11	433,19
SD	62,49	88,71	70,84	66,07	59,81	38,14

Ryc. 39. Średnie wartości KoA wraz z SD dla mocznika po kolejnych reutilizacjach dializatorów kuprofanowych.

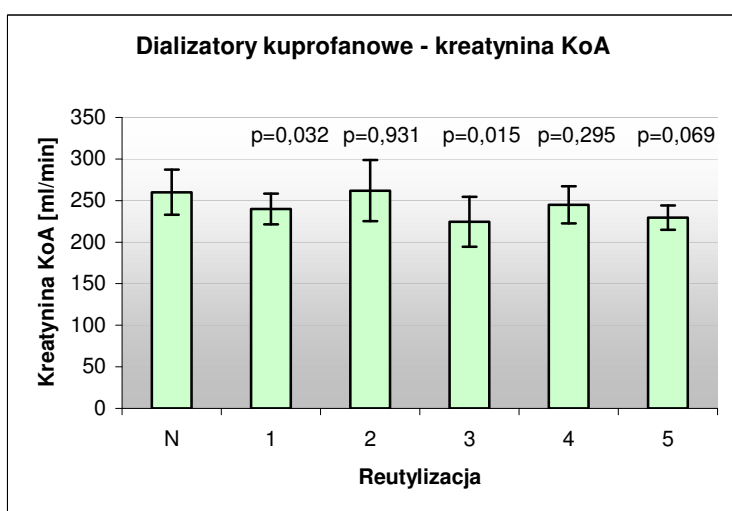
Tab.10. Dializatory kuprofanowe: wartości K_D i KoA dla nowych dializatorów oraz kolejnych reutilizacjach.

Pacjent	N		1		2		3		4		5	
	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA
1	117,4	269,72	112,4	241,92	110,4	231,92	112,1	240,39	107	216,13	105,8	210,89
2	129,6	292,84	122,3	255,09	127	278,58	121,1	249,5	126,8	277,52	121,3	250,42
3	115,4	224,95	115	223,34	130,8	299,78	112,6	213,94	118,4	237,49	118	235,77
4	135,6	272,28	132,7	260,24	138,5	284,97	128	241,97	127,7	240,86	123,5	225,77
5	122,2	240,67	116,7	219,17	115,4	214,4	103,9	176,61	124,9	252,11	118	224,05



	N	1	2	3	4	5
K_D	124,04	119,82	124,42	115,54	120,96	117,32
SD	8,47	8,06	11,44	9,25	8,61	6,85

Ryc. 40. Średnie wartości K_D wraz z SD dla kreatyniny wraz z SD po kolejnych reutilizacjach dializatorów kuprofanowych.

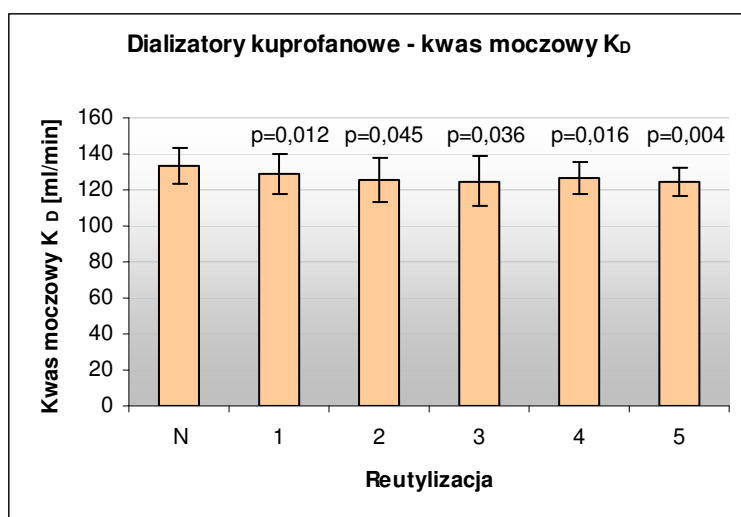


	N	1	2	3	4	5
KoA	260,09	239,95	261,93	224,48	244,82	229,38
SD	27,04	18,39	36,74	29,95	22,44	14,72

Ryc. 41. Średnie wartości KoA wraz z SD dla kreatyniny po kolejnych reutilizacjach dializatorów kuprofanowych.

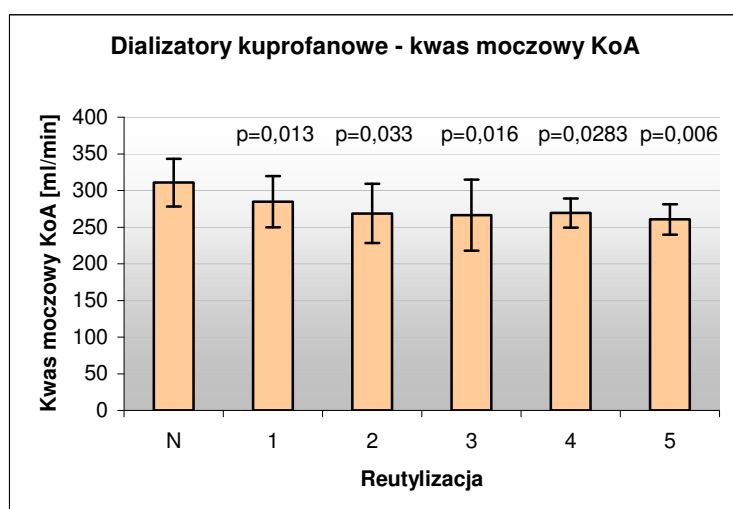
Tab.11. Dializatory kuprofanowe: wartości K_D i KoA dla nowych dializatorów oraz kolejnych reutilizacjach.

Pacjent	N		1		2		3		4		5	
	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA
1	127	339,02	121	292,77	116,5	264,39	117,9	272,75	115,4	258,08	116,3	263,22
2	132	306,94	129	289,46	129,5	292,28	126	273,35	128,6	287,24	127	278,58
3	129	289,46	126	273,35	127	278,58	123	258,42	125,5	270,78	122,2	254,62
4	150,8	347,82	148	332,03	143	306,13	147,9	331,48	139,3	288,6	137	278,32
5	129	270,76	121	235,78	112	202,45	110	195,75	122,4	241,49	119,1	228,27



	N	1	2	3	4	5
K_D	133,56	129	125,6	124,96	126,24	124,32
SD	9,8	11,16	12,12	14,18	8,79	8,12

Ryc. 42. Średnie wartości K_D wraz z SD dla kwasu moczowego po kolejnych reutilizacjach dializatorów kuprofanowych.



	N	1	2	3	4	5
KoA	310,8	284,68	268,77	266,35	269,24	260,6
SD	32,56	34,82	40,19	48,42	19,97	20,77

Ryc. 43. Średnie wartości KoA wraz z SD dla kwasu moczowego po kolejnych reutilizacjach dializatorów kuprofanowych.

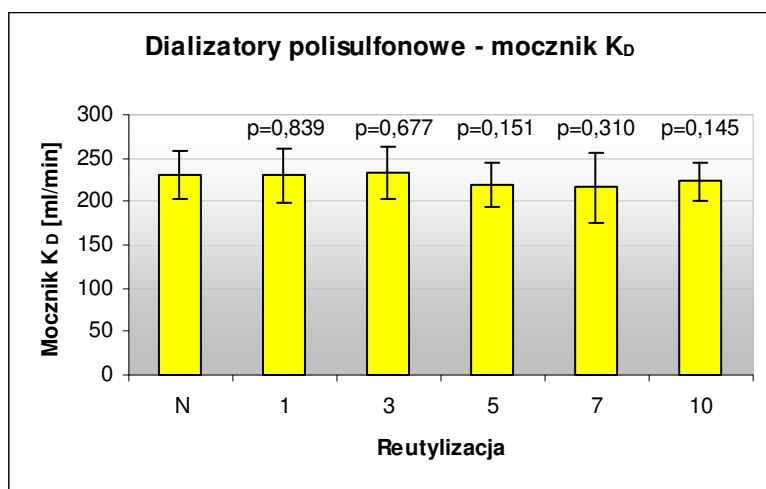
Analiza zachowania się klirensu rzeczywistego poszczególnych substancji markerowych toksyn niskocząsteczkowych po kolejnych reutilizacjach dializatorów kuprofanowych (w zakresie 1 - 5) nie wykazywała istotnych statystycznie spadków. Zarówno wartości klirensów jak i odpowiadających im współczynników przepuszczalności masowej KoA (ryc. 38, 39, 40, 41) dla mocznika i kreatyniny w kolejnych użyciach dializatora pozostawały niezmiennione, co jest zgodne z danymi piśmiennictwa.

Niemniej jednak, w przypadku kwasu moczowego (m.cz. 168 Da), po 5. reutilizacji stwierdzono już znamienne statystycznie spadek wartości jego klirensu ($p = 0,004$) oraz wartości odpowiadającego mu współczynnika przepuszczalności masowej KoA ($p = 0,006$) (ryc. 42, 43).

4.2.1.2. Dializatory polisulfonowe

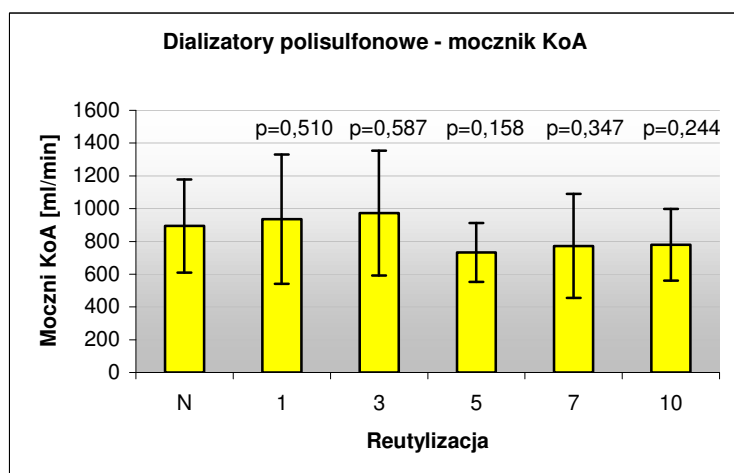
Tab.12. Dializatory polisulfonowe: wartości K_D i KoA dla nowych dializatorów oraz po kolejnych reutilizacjach.

Pacjent	N		1		3		5		7		10	
	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA
1 (F7)	212	666,11	210,2	646,08	207	612,91	214	689,66	153,4	292,22	205,8	601,19
2 (F7)	220,7	780,77	217	727,89	223,8	831,1	225,4	859,71	233,7	1050,15	221,8	797,93
3 (F7)	210	643,92	203,5	579,72	234,9	1086,13	184,9	441,9	206,3	606,03	199	541,06
4 (F8)	234,9	1086,13	240,9	1327,89	218,9	754,17	221,1	786,93	229	932,22	234,9	1086,13
5 (F8)	276	1292,07	279,5	1398,48	284,3	1582,05	254,9	886,46	261,3	981,4	253,9	873,07



	N	1	3	5	7	10
K_D	230,72	230,22	233,78	220,06	216,74	223,08
SD	27,14	30,95	29,96	25,08	40,45	22,19

Ryc. 44. Średnie wartości K_D wraz z SD dla mocznika po kolejnych reutilizacjach dializatorów polisulfonowych.

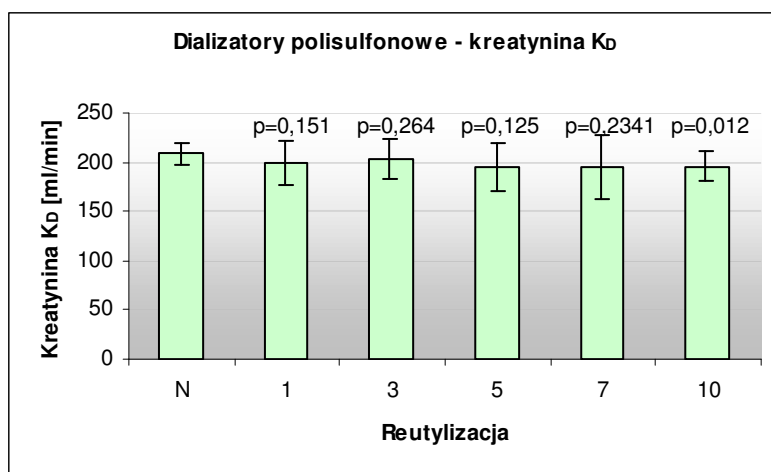


	N	1	3	5	7	10
KoA	893,8	936,01	973,27	732,93	772,4	779,87
SD	284,02	394,26	381,25	179,67	318,05	218,95

Ryc. 45. Średnie wartości KoA wraz z SD dla mocznika po kolejnych reutilizacjach dializatorów polisulfonowych.

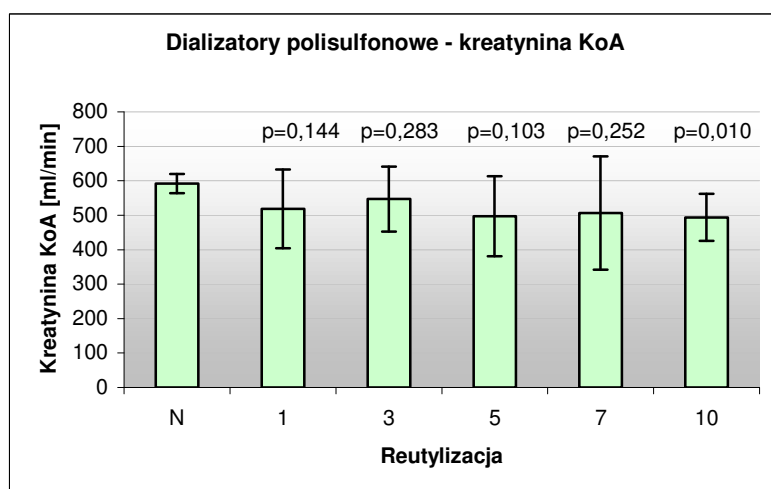
Tab.13. Dializatory polisulfonowe: wartości K_D i KoA dla nowych dializatorów oraz po kolejnych reutilizacjach.

Pacjent	N		1		3		5		7		10	
	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA
1 (F7)	201,3	560,3	188,7	465,91	195	509,91	195,6	514,41	155,2	299,02	183,2	431,71
2 (F7)	204,7	590,76	192	488,25	194,8	508,42	185	442,51	203,5	579,72	183,9	435,87
3 (F7)	202,3	569	171,7	370,11	192,7	493,18	165,8	342,69	180,4	415,57	189,4	470,53
4 (F8)	207,6	618,91	209,3	636,45	194,8	508,42	197,4	528,27	194	502,54	204,1	585,2
5 (F8)	228,8	619,9	230,3	631,71	239,8	714,71	233,5	658,01	241,8	734,26	218,4	545,87



	N	1	3	5	7	10
K_D	208,94	198,4	203,42	195,46	194,98	195,8
SD	11,36	22,27	20,36	24,69	31,86	15,17

Ryc. 46. Średnie wartości K_D wraz z SD dla kreatyniny po kolejnych reutilizacjach dializatorów polisulfonowych.

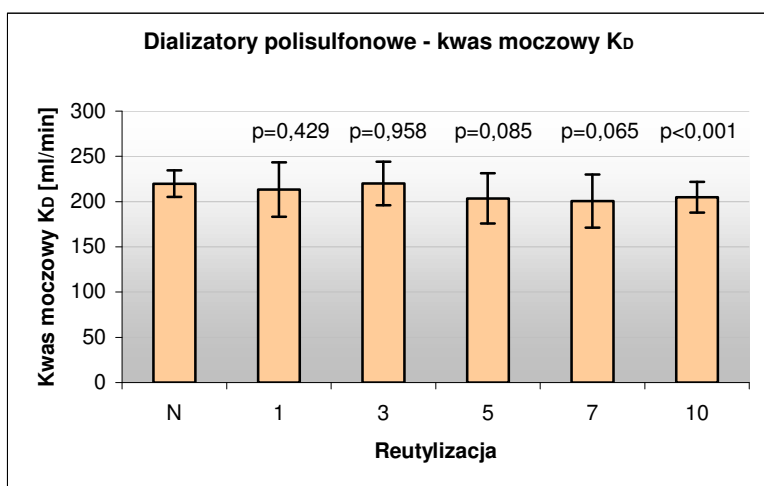


	N	1	3	5	7	10
KoA	591,77	518,48	546,93	497,18	506,22	493,84
SD	27,56	114,49	94,04	116,17	164,75	68,59

Ryc. 47. Średnie wartości KoA wraz z SD dla kreatyniny po kolejnych reutilizacjach dializatorów polisulfonowych.

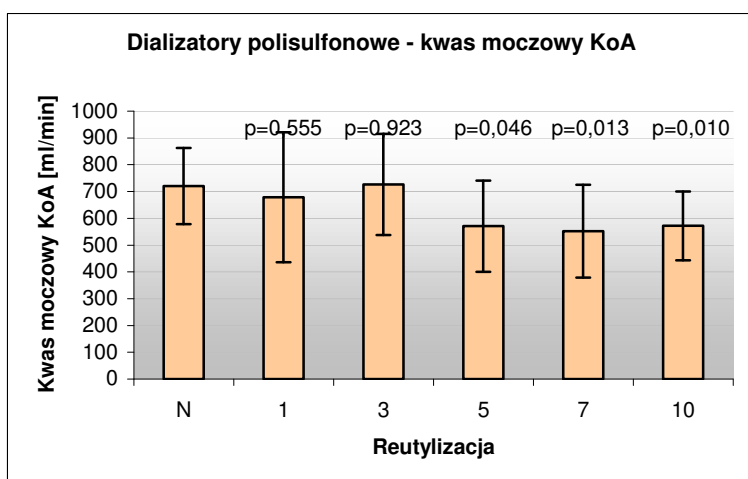
Tab. 14. Dializatory polisulfonowe: wartości K_D i KoA dla nowych dializatorów oraz po kolejnych reutilizacjach.

Pacjent	N		1		3		5		7		10	
	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA
1 (F7)	207	612,91	197	525,74	201	557,73	200,7	555,18	159	313,93	192	488,25
2 (F7)	214	689,66	206	603,12	203	575,21	189	467,88	198,5	537,02	197,2	526,7
3 (F7)	207,8	620,93	178	402,36	209,5	638,57	168	352,63	190	474,54	188,9	467,22
4 (F8)	230,3	961,77	230,7	971,28	228,6	923,52	219	755,61	218,4	747,09	221	785,38
5 (F8)	240	716,63	255,2	890,55	258,4	936,26	240,5	721,46	236,9	687,74	225	591,34



	N	1	3	5	7	10
K_D	219,82	213,38	220,1	203,44	200,56	204,82
SD	14,66	30,09	24,02	27,78	29,5	16,92

Ryc. 48. Średnie wartości K_D wraz z SD dla kwasu moczowego po kolejnych reutilizacjach dializatorów polisulfonowych.



	N	1	3	5	7	10
KoA	720,38	678,61	726,26	570,55	552,06	571,78
SD	142,01	242,88	188,36	169,77	172,76	128,4

Ryc. 49. Średnie wartości KoA wraz z SD dla kwasu moczowego po kolejnych reutilizacjach dializatorów polisulfonowych.

Analiza zachowania się klirensu rzeczywistego poszczególnych substancji markerowych toksyn niskocząsteczkowych po kolejnych reutilizacjach dializatorów polisulfonowych (konstruowanych z założenia do wielokrotnej reutilizacji) w zakresie 1 - 10 nie wykazywała istotnych statystycznie spadków. Zarówno wartości klirensów jak i odpowiadających im współczynników przepuszczalności masowej KoA dla mocznika i kreatyniny w kolejnych użyciach dializatora pozostawały niezmiennione, co jest zgodne z doniesieniami piśmiennictwa (ryc. 44, 45, 46, 47).

Niemniej jednak, w przypadku kwasu moczowego, po 10. reutilizacji stwierdzono już znamienne statystycznie spadki wartości jego klirensu ($p < 0,001$) oraz wartości odpowiadającego mu współczynnika przepuszczalności masowej KoA ($p = 0,01$; ryc. 48, 49).

Należy zauważyć, że w przypadku obydwu typów dializatorów klirens kwasu moczowego - pomimo większej masy cząsteczkowej - przewyższa klirens kreatyniny. Przyczyną tego zjawiska może być różna od mocznika i kreatyniny kinetyka śródodializacyjna kwasu moczowego [182, 188].

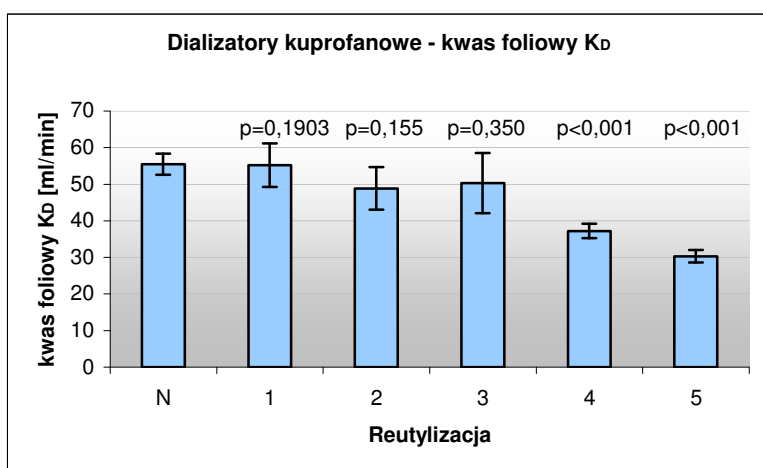
4.2.2. Wartości klirensu rzeczywistego (K_D) i współczynnika przepuszczalności masowej (KoA) dla markera średnicząsteczkowego: kwasu foliowego

Wpływ reutilizacji kwasem nadctowym dializatorów *low-flux* na zachowanie się klirensu cząstek zaczyna się wyraźnie uwidaczniać w momencie analizy eliminacji kwasu foliowego, będącego markerem o masie cząsteczkowej 441 Da.

4.2.2.1. Dializatory kuprofanowe

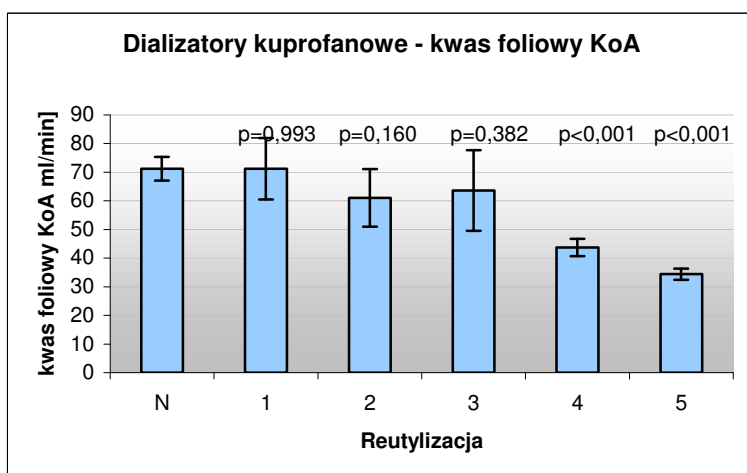
Tab. 15. Dializatory kuprofanowe: wartości K_D i KoA dla nowych dializatorów oraz po kolejnych reutilizacjach.

Pacjent	N		1		2		3		4		5	
	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA
1	53,91	70,98	56,87	76,26	56,2	75,05	59,5	81,12	37,45	44,86	27,8	31,66
2	55,5	71,49	61	80,96	46,8	57,62	46,2	56,71	36,1	42,18	29,3	33,17
3	57	74,02	60,3	79,72	43,9	53,27	44,4	54,01	40,6	48,47	32	36,58
4	59,3	75,14	49	59,3	43,54	51,47	42,5	50,02	36,3	41,63	31,45	35,37
5	51,65	64,45	48,8	60,05	53,8	67,85	58,9	76,21	35,7	41,33	31	35,15



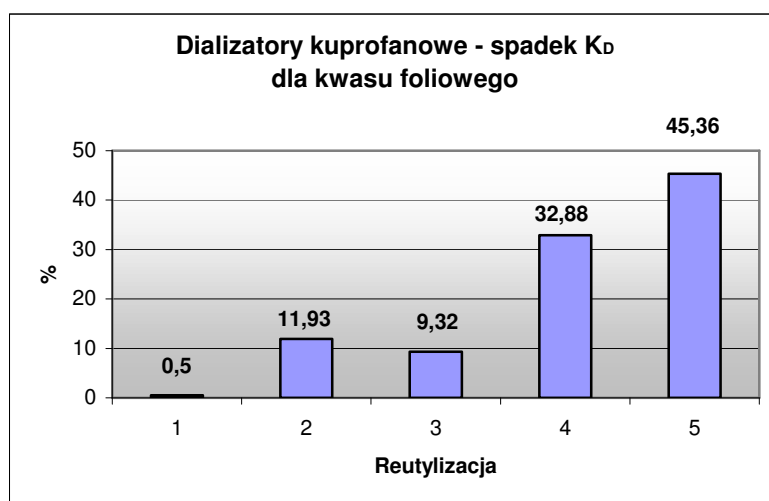
	N	1	2	3	4	5
K_D	55,47	55,19	48,85	50,3	37,23	30,31
SD	2,92	5,95	5,82	8,23	1,99	1,73

Ryc. 50. Średnie wartości K_D wraz z SD dla kwasu foliowego po kolejnych reutilizacjach dializatorów kuprofanowych.

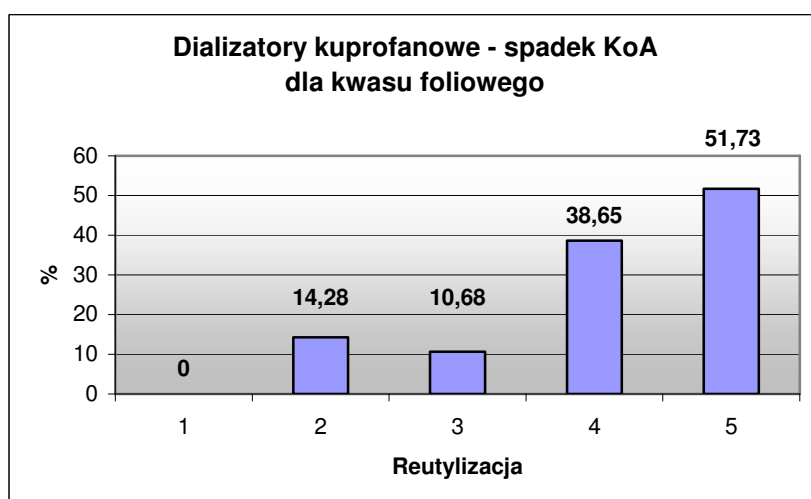


	N	1	2	3	4	5
KoA	71,22	71,26	61,05	63,61	43,69	34,38
SD	4,16	10,72	10,08	14,05	3,01	1,95

Ryc. 51. Średnie wartości KoA wraz z SD dla kwasu foliowego po kolejnych reutilizacjach dializatorów kuprofanowych.



Ryc. 52. Spadek wartości K_D dla kwasu foliowego po kolejnych reutilizacjach dializatorów kuprofanowych.



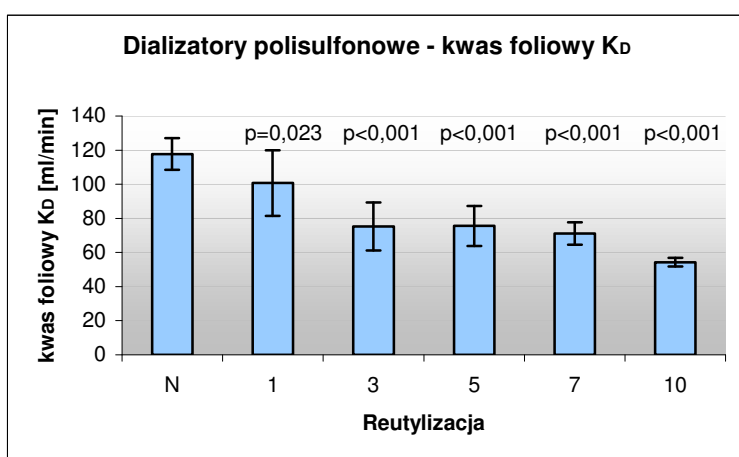
Ryc. 53. Spadek wartości K_oA dla kwasu foliowego po kolejnych reutilizacjach dializatorów kuprofanowych.

W przypadku dializatora kuprofanowego, wartość klirensu kwasu foliowego istotnie statystycznie spadła po 4. (o 32,9%) i 5. (o 45,4%) reutilizacji filtra ($p < 0,001$). Wartości współczynnika przepuszczalności masowej K_oA zachowywały się analogicznie – istotny statystycznie spadek eliminacji występował po 4. (o 38,7%) i 5. (o 51,7%) reutilizacji dializatora (ryc. 50, 51, 52, 53).

4.2.2.2. Dializatory polisulfonowe

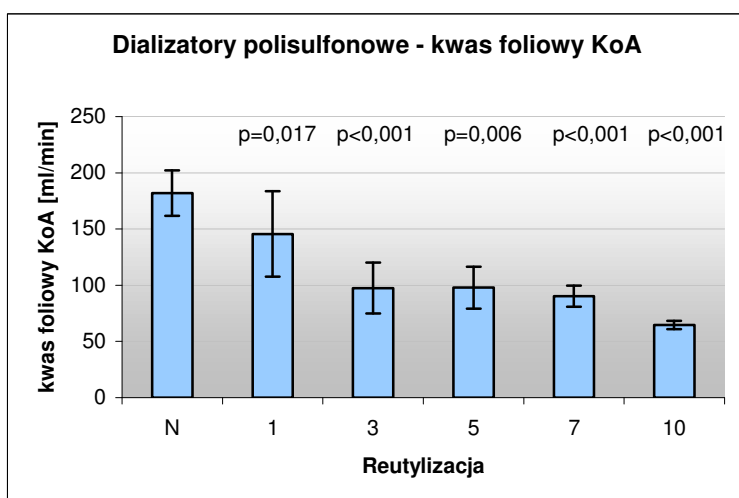
Tab.16. Dializatory polisulfonowe: wartości K_D i KoA dla nowych dializatorów oraz po kolejnych reutilizacjach.

Pacjent	N		1		3		5		7		10	
	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA	K_D	KoA
1(F7)	110	165,67	89,7	123,34	72,5	92,91	71,1	90,62	70	88,84	50,3	59,3
2(F7)	115	177,41	87,3	118,83	61	74,8	63,5	78,6	68,1	85,79	53,55	63,88
3(F7)	108,5	162,26	83,4	111,69	62,8	77,53	67,32	84,55	64,1	79,52	56,1	67,55
4(F8)	128,1	211,13	119,5	188,48	89,5	122,96	86,7	117,71	72,1	92,26	56,9	68,72
5(F8)	127	193,1	123,6	185,3	90,3	119,2	89,4	117,62	81,7	104,62	54,6	63,94



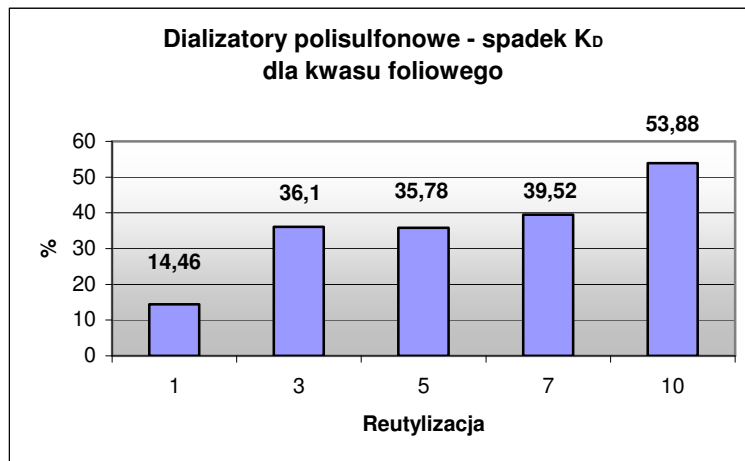
	N	1	3	5	7	10
K_D	117,72	100,7	75,22	75,6	71,2	54,29
SD	9,29	19,22	14,1	11,71	6,57	2,58

Ryc. 54. Średnie wartości K_D wraz z SD dla kwasu foliowego po kolejnych reutilizacjach dializatorów polisulfonowych.

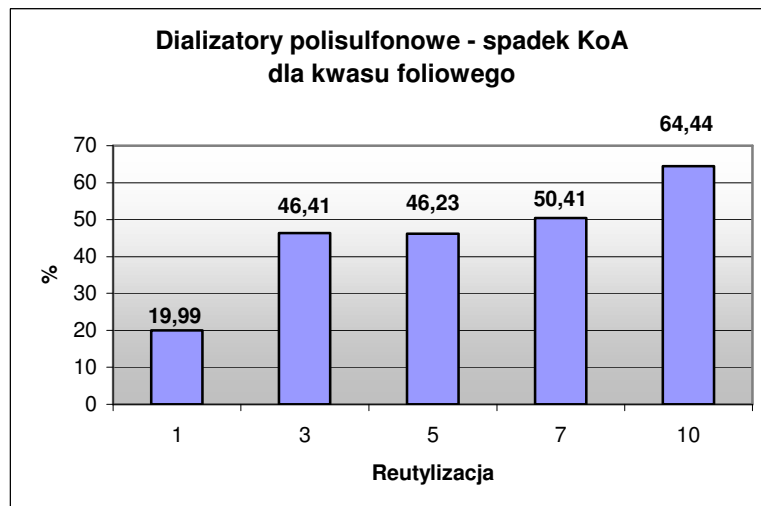


	N	1	3	5	7	10
KoA	181,91	145,53	97,48	97,82	90,21	64,68
SD	20,31	38	22,66	18,61	9,32	3,69

Ryc. 55. Średnie wartości KoA wraz z SD dla kwasu foliowego po kolejnych reutilizacjach dializatorów polisulfonowych.



Ryc. 56. Spadek wartości K_D dla kwasu foliowego po kolejnych reutilizacjach dializatorów polisulfonowych.



Ryc. 57. Spadek wartości K_oA dla kwasu foliowego po kolejnych reutilizacjach dializatorów polisulfonowych.

W przypadku dializatora polisulfonowego wartość klirensu kwasu foliowego istotnie statystycznie spadła już po 3. reutilizacji (znamienny statystycznie spadek utrzymywał się do 10. reutilizacji filtra; $p < 0,001$), przy czym klirens zachowywał się dosyć stabilnie do 7. reutilizacji (spadek eliminacji o 36 – 39% w porównaniu do nowego filtra), po której obserwowano dalszy spadek jego wartości. W momencie przekroczenia 10. reutilizacji dializatora klirens kwasu foliowego zmniejszył się o 53,9%.

Wartości współczynnika przepuszczalności masowej KoA zachowywały się analogicznie – istotny statystycznie spadek ($p < 0,001$) występował od 3. i w miarę stabilnie utrzymywał się do 7. (spadek KoA od 46 do 50%) reutilizacji dializatora, po czym obserwowano dalsze jego zmniejszenie – po 10. reutilizacji wartość KoA była o 64,4% mniejsza od wartości nowego filtra (ryc. 54, 55, 56, 57).

Analiza powyższych danych oznacza, że po szóstym (w przypadku błon kuprofanowych) i po jedenastym (w przypadku błon polisulfonowych) użyciu dializatora *low – flux* cząsteczki o masie cząsteczkowej rzędu 441 Da usuwane są tylko w połowie w porównaniu do filtrów nie reutilizowanych.

4.2.3. Wartości stężeń witaminy B₁₂ przed oraz za dializatorem

4.2.3.1. Dializatory kuprofanowe

Tab.17. Dializatory kuprofanowe: wartości stężeń witaminy B₁₂ dla nowych dializatorów oraz po kolejnych reutilizacjach.

Pacjent	N		1		2		3		4		5	
	przed	za	przed	za	przed	za	przed	za	przed	za	przed	za
1	243,4	245,1	196,6	228,4	231,9	258	223,9	220,1	215,1	254,9	225,1	211
2	351,6	399,8	334,8	382,4	421	444,8	251,4	281	225,9	291,3	197,6	222
3	333,9	396,8	494,8	393,4	348,3	345,3	343,6	404	313,4	319,1	349,6	389,9
4	359,1	388,5	387,8	475,9	330,6	339,1	341,9	404,7	284,8	321	344,3	393,5
5	508,1	531,7	402,8	451,6	535,2	583,5	449,9	492,1	438,3	496,1	474,8	521,7

4.2.3.2. Dializatory polisulfonowe

Tab.18. Dializatory polisulfonowe: wartości stężeń witaminy B₁₂ dla nowych dializatorów oraz po kolejnych reutilizacjach.

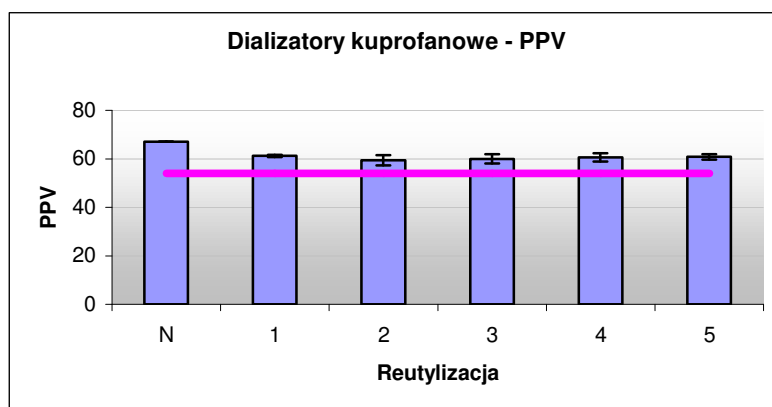
Pacjent	N		1		3		5		7		10	
	przed	za	przed	za	przed	za	przed	za	przed	za	przed	za
1 (F7)	162,9	178,7	184,1	215,7	168,4	222,7	220,4	241,6	209	215,3	205,8	220
2 (F7)	199,9	218,7	183	202,7	223	230,6	275,9	320,2	318,2	395,3	241,9	253,9
3 (F7)	354,8	399,8	427,5	561,8	453,9	487,7	575,8	622,2	418,4	514,3	307,5	419,5
4 (F8)	144,6	162,2	213,3	222,2	210,3	243,2	156,7	259,9	186,7	221,7	206,7	232,8
5 (F8)	416,6	487,1	367,7	494,5	353,2	420,3	342,7	311,9	451,2	507	266,9	363,7

Witamina B₁₂ jest często wykorzystywanym przez producentów dializatorów markerem służącym do oceny wartości kliernsów dla związków o masie cząsteczkowej około 1300 Da. W związku z tym, w niniejszej pracy również posłużono się tą substancją do oceny zachowania się wartości kliernsów badanych rodzajów błon dla związków o zbliżonej masie cząsteczkowej. Niemniej jednak, okazało się, że stężenia witaminy B₁₂ oznaczanej we krwi za dializatorem były w prawie wszystkich przypadkach większe (lub równe) aniżeli stężenia stwierdzone przed filtrem. Taka sytuacja może mieć miejsce jedynie w przypadku, kiedy

klirens danej substancji jest równy lub bliski zeru. Przyczyny tego zjawiska szczegółowo omówiono w dyskusji.

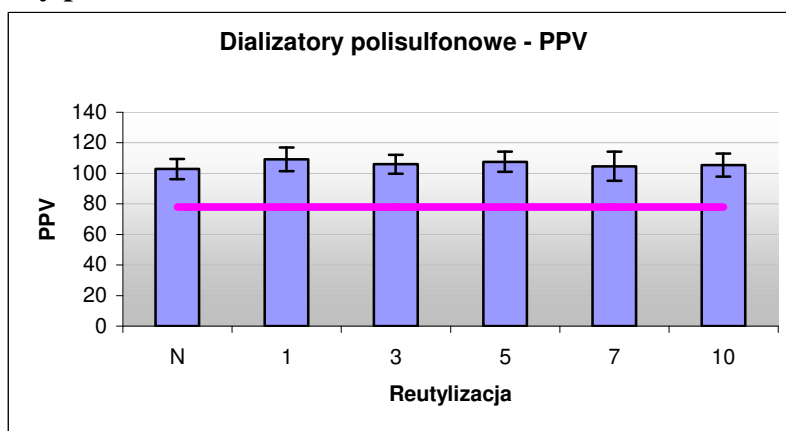
4.2.4. WARTOŚCI PPV DIALIZATORÓW

4.2.4.1. Dializatory kuprofanowe



Ryc. 58. Wartości PPV dializatorów kuprofanowych po kolejnych reutilizacjach (pozioma linia wyznacza 80% wyjściowej wartości FBV).

4.2.4.2. Dializatory polisulfonowe



Ryc. 59. Wartości PPV dializatorów polisulfonowych po kolejnych reutilizacjach (pozioma linia wyznacza 80% wyjściowej wartości FBV).

Analiza parametru PPV – objętości dializatora popłukaniu, będącego podstawowym kryterium dopuszczenia dializatora do ponownego użycia zarówno w przypadku dializatorów kuprofanowych jak i polisulfonowych przez cały czas trwania badania utrzymywana była zgodnie z wytycznymi, przekraczała bowiem 80% wyjściowej wartości FBV (ryc. 58, 59). Oznacza to działania zgodne z wytycznymi zarówno międzynarodowymi jak i polskimi [42].

4.3. WYNIKI BADANIA BIOZGODNOŚCI BŁON DIALIZACYJNYCH

4.3.1. Interleukina 6 (IL-6)

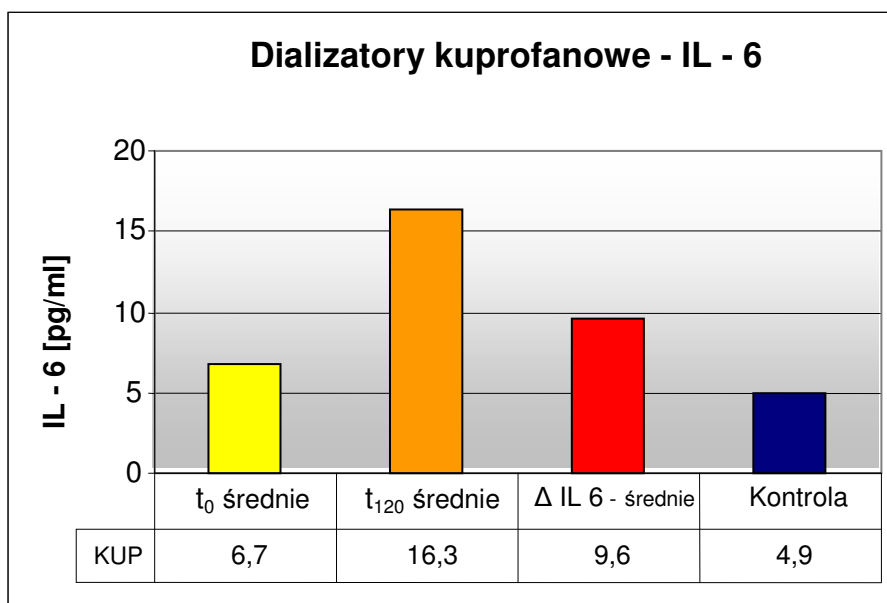
W tabelach 19 i 20 oraz na rycinach 60 i 61 przedstawiono uzyskane w toku badań wyniki stężeń IL-6, wraz ze średnimi wartościami stężeń tej cytokiny na początku sesji HD oraz po 120 minutach jej trwania.

Tab. 19. Dializatory kuprofanowe. Wartości stężeń IL-6 uzyskane w kolejnych krotnościach użycia dializatora, w czasie t_0 oraz t_{120} .

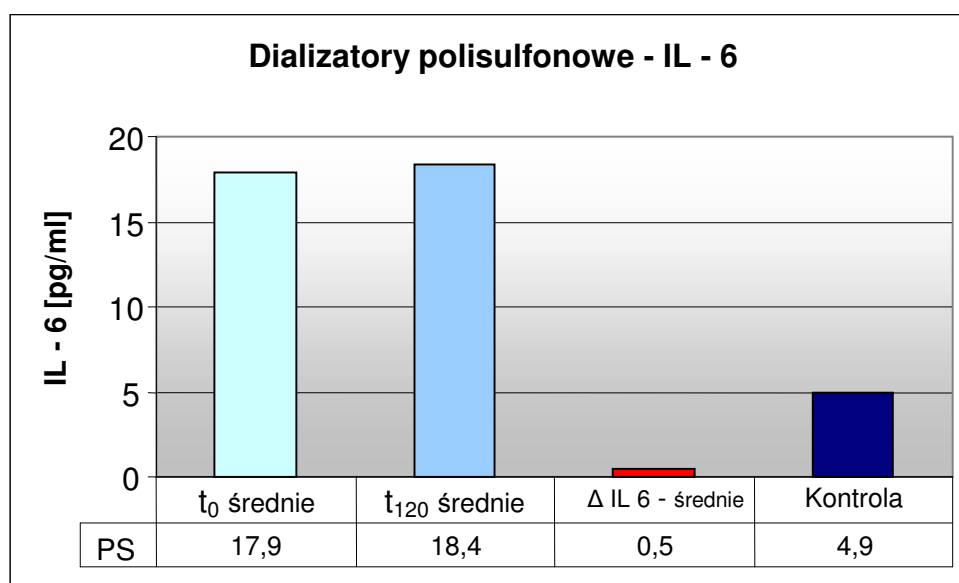
Reutilizacja KUP Pacjent	N		1		2		3		4		5	
	t_0	t_{120}	t_0	t_{120}	t_0	t_{120}	t_0	t_{120}	t_0	t_{120}	t_0	t_{120}
1	3	12,6	7,8	14,5	13,6	27,8	2,5	7,8	2,5	11,8	4,9	16,6
2	7,7	16,5	3,6	8,2	3,3	17,5	3,9	25,8	10,7	18,6	4,6	14,9
3	5,3	19,5	7,6	30	8	13	6,5	17,9	12,1	25,3	15,7	20
4	7,5	7,8	1	7,6	4,4	10,5	5,1	17,6	6,2	15,6	1,1	7,2
5	5,3	16,7	6,3	12,6	17,1	23,9	7,8	17,1	7,9	10,5	7,5	24,3

Tab. 20. Dializatory polisulfonowe. Wartości stężeń IL-6 uzyskane w kolejnych krotnościach użycia dializatora, w czasie t_0 oraz t_{120} .

Reutilizacja PS Pacjent	N		1		3		5		7		10	
	t_0	t_{120}	t_0	t_{120}	t_0	t_{120}	t_0	t_{120}	t_0	t_{120}	t_0	t_{120}
1	18,5	17,9	23,1	25,1	10	11,5	13,2	14,4	21,9	22,5	18,5	19,9
2	38,4	38,8	20,9	21,9	25,3	26,1	38,4	31	40,9	35,3	31	31,2
3	13,3	11	14,5	20	38,4	38,8	11	12,6	12,7	12,1	16,6	20
4	25	26,1	17,7	16,9	16,5	17	12,6	13,8	6,2	6,7	7,2	7,5
5	3,9	5	9	10,5	7,2	8,7	7,5	8,8	11	12,1	6,7	7,4



Ryc. 60. Dializatory kuprofanowe. Średnie wartości stężeń IL-6 w czasie t_0 i t_{120} oraz średnie przyrosty stężenia IL-6.



Ryc. 61. Dializatory polisulfonowe. Średnie wartości stężeń IL-6 w czasie t_0 i t_{120} oraz średnie przyrosty stężenia IL-6.

4.3.2. Czynniki martwicy nowotworów α (TNF α)

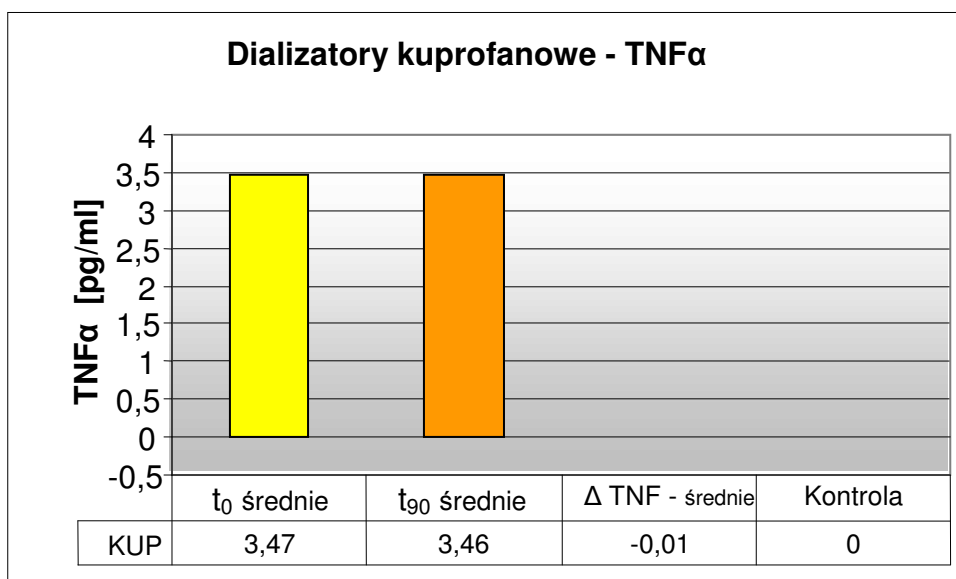
W tabelach 21 i 22 oraz na rycinach 62 i 63 przedstawiono uzyskane w toku badań wyniki stężeń TNF α , wraz ze średnimi wartościami stężeń tej cytokiny na początku sesji HD oraz po 90 minutach jej trwania.

Tab. 21. Dializatory kuprofanowe. Wartości stężeń TNF α uzyskane w kolejnych krotnościach użycia dializatora, w czasie t_0 oraz t_{90} .

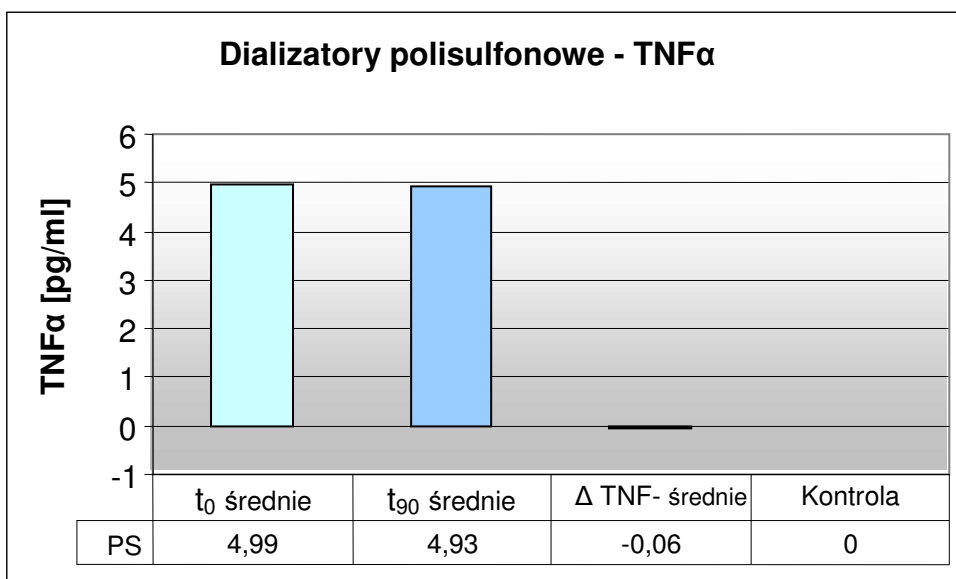
Reutilizacja KUP Pacjent	N		1		2		3		4		5	
	t_0	t_{90}	t_0	t_{90}	t_0	t_{90}	t_0	t_{90}	t_0	t_{90}	t_0	t_{90}
1	6,4	6,2	6,4	7	6	4,7	4,4	3,7	3,8	3,2	3	2,4
2	2,4	3,3	5,1	3,1	2,6	2,1	2,8	2,8	2,5	2,4	2,8	3,5
3	2,8	2,3	1,6	2,2	2,4	2,2	4,4	3,3	3,7	3,1	2,5	3,6
4	3,2	3,1	3,9	2	2,4	2,4	1,9	4,4	2,6	2,5	2,8	3,2
5	3,5	3,6	3,8	3,1	3,7	3,6	3,1	4,8	4,4	6,4	3,3	3,6

Tab. 22. Dializatory polisulfonowe. Wartości stężeń TNF α uzyskane w kolejnych krotnościach użycia dializatora, w czasie t_0 oraz t_{90} .

Reutilizacja PS Pacjent	N		1		3		5		7		10	
	t_0	t_{90}	t_0	t_{90}	t_0	t_{90}	t_0	t_{90}	t_0	t_{90}	t_0	t_{90}
1	6,6	6	6,2	8,2	7,4	5,9	5,8	4,2	3,5	3,1	4,4	3,4
2	4,1	3,7	3,1	3,4	3,3	3,4	3,8	3,3	3,9	3,5	2,6	3,3
3	3,3	2,6	2,6	4,6	4,3	4	4,8	5,4	5,6	6,8	6,3	4,7
4	5,3	5,6	5,7	6,1	4,9	5,2	5,7	6,1	4,9	5,3	5,6	5,1
5	4,6	5,1	7,2	5,6	5,1	5,3	6,1	6,5	5,7	6,1	7,3	6,5



Ryc. 62. Dializatory kuprofanowe. Średnie wartości stężeń TNF α w czasie t₀ i t₉₀ oraz średnie przyrosty stężeń TNF α .



Ryc. 63. Dializatory polisulfonowe. Średnie wartości stężeń TNF α w czasie t₀ i t₉₀ oraz średnie przyrosty stężeń TNF α .

4.3.3. Graficzne przedstawienie, opracowanie statystyczne i omówienie wyników badania biogodności błon dializacyjnych

4.3.3.1. Interleukina 6 (IL-6)

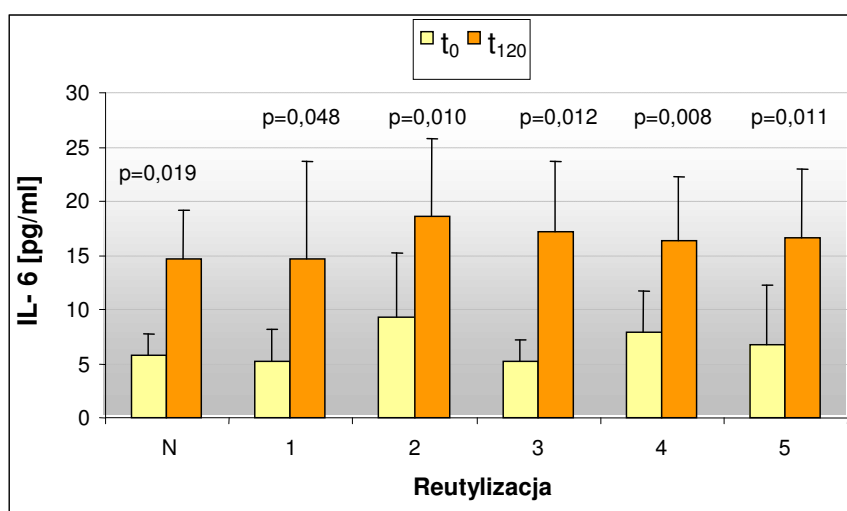
W badaniu analizowano zmiany stężenia IL-6 (w czasie $t_0 \rightarrow t_{120}$) po kolejnych krotnościach użycia dializatorów porównując stężenia IL-6 obserwowane po kolejnych reutilizacjach z wartościami pierwotnymi, obserwowanymi podczas stosowania nowych błon (N). Porównania przeprowadzono dla pełnych profili obserwacji IL-6 zarówno dla błon kuprofanowych jak i polisulfonowych.

t_0 – stężenia IL-6 przed rozpoczęciem HD

t_{120} – stężenia IL-6 w 120 minucie trwania HD

Tab. 23. Dializatory kuprofanowe. Zmiany wartości stężeń IL-6 w trakcie dializy na nowym oraz 1, 2, 3, 4, 5 - krotnie reutilizowanym dializatorze.

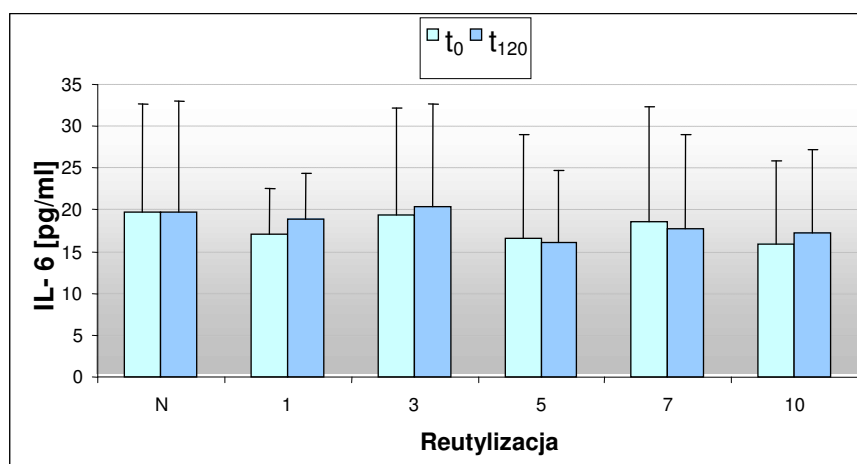
Dializatory Kuprofanowe	t_0	SD	t_{120}	SD	p	Delta
N	5,77	1,92	14,62	4,53	0,019	8,84
1	5,27	2,91	14,58	9,09	0,048	9,31
2	9,29	5,93	18,54	7,26	0,010	9,25
3	5,17	2,07	17,24	6,38	0,012	12,07
4	7,89	3,78	16,36	5,93	0,008	8,47
5	6,77	5,48	16,59	6,36	0,011	9,82



Ryc. 64. Dializatory kuprofanowe. Zmiany wartości stężeń IL-6 w trakcie dializy na nowym oraz 1, 2, 3, 4, 5 - krotnie reutilizowanym dializatorze.

Tab. 24. Dializatory polisulfonowe. Zmiany wartości stężeń IL-6 w trakcie dializy na nowym oraz 1, 3, 5, 7, 10 - krotnie reutilizowanym dializatorze.

Dializatory Polisulfonowe	t ₀	SD	t ₁₂₀	SD	p	delta
N	19,82	12,94	19,76	13,23	NS	-0,06
1	17,04	5,55	18,88	5,55	NS	1,84
3	19,48	12,66	20,42	12,23	NS	0,94
5	16,54	12,42	16,12	8,59	NS	-0,42
7	18,54	13,73	17,74	11,36	NS	-0,80
10	16	9,94	17,2	10,01	NS	1,20

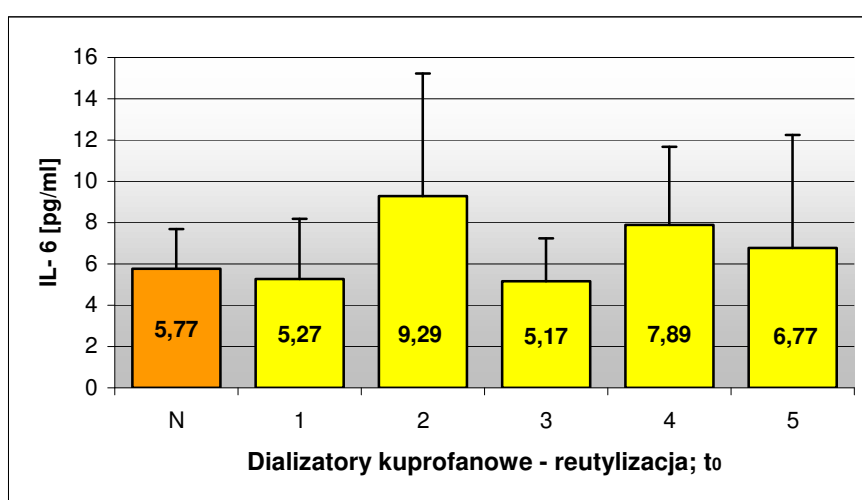


Ryc. 65. Dializatory polisulfonowe. Zmiany wartości stężeń IL-6 w trakcie dializy na nowym oraz 1, 3, 5, 7, 10 - krotnie reutilizowanym dializatorze.

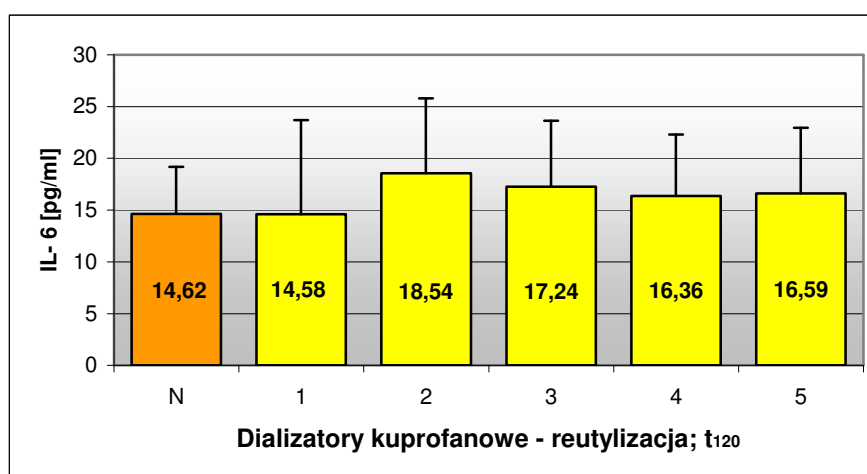
Przyrost IL-6 w trakcie dializy na nowym oraz 1, 2, 3, 4, 5 - krotnie reutilizowanym dializatorze kuprofanowym okazał się znamieny statystycznie ($p < 0,048$) dla każdego użycia dializatora. Natomiast przyrost stężeń IL-6 w trakcie dializy na nowym oraz 1, 3, 5, 7, 10 - krotnie reutilizowanym dializatorze polisulfonowym nie osiągnął znamienności statystycznej w żadnym przypadku użycia dializatora (tab. 23, 24; ryc. 64, 65)

Tab. 25. Dializatory kuprofanowe. Istotność statystyczna zmian wartości stężeń IL-6 po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatora w czasie t_0 oraz t_{120} w porównaniu do stężenia obserwowanego dla nowej błony.

Dializatory Kuprofanowe	t_0	p	t_{120}	p	SD t_0	SD t_{120}
N	5,77	xxx	14,62	xxx	1,92	4,53
1	5,27	NS	14,58	NS	2,91	9,09
2	9,29	NS	18,54	NS	5,93	7,26
3	5,17	NS	17,24	NS	2,07	6,38
4	7,89	NS	16,36	NS	3,78	5,93
5	6,77	NS	16,59	NS	5,48	6,36



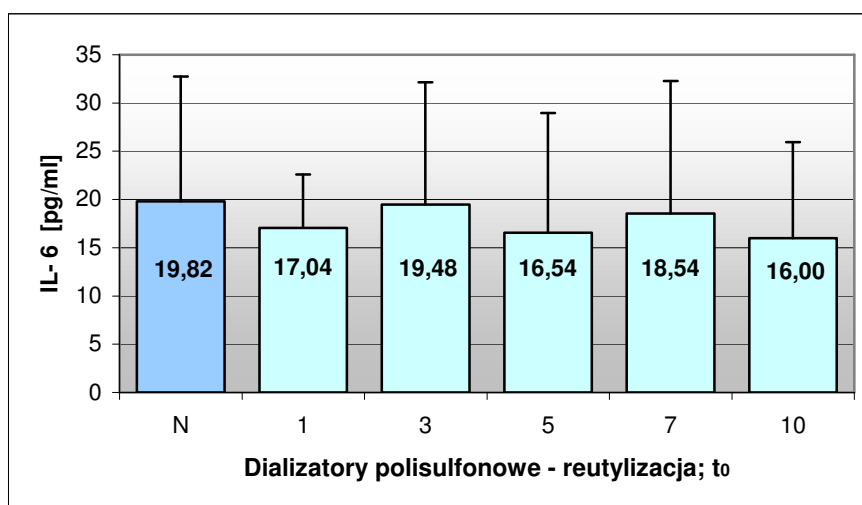
Ryc. 66. Dializatory kuprofanowe. Istotność statystyczna zmian wartości stężeń IL-6 po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatora w czasie t_0 w porównaniu do stężenia obserwowanego dla nowej błony.



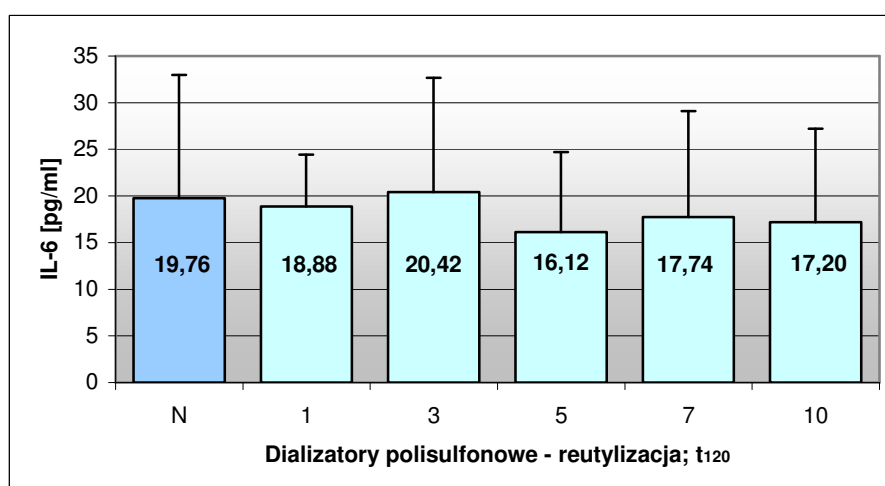
Ryc. 67. Dializatory kuprofanowe. Istotność statystyczna zmian wartości stężeń IL-6 po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatora w czasie t_{120} w porównaniu do stężenia obserwowanego dla nowej błony.

Tab. 26. Dializatory polisulfonowe. Istotność statystyczna zmian wartości stężeń IL-6 po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatora w czasie t_0 oraz t_{120} w porównaniu do stężenia obserwowanego dla nowej błony.

Dializatory Polisulfonowe	t_0	p	t_{120}	p	SD t_0	SD t_{120}
N	19,82	xxx	19,76	xxx	12,94	13,23
1	17,04	NS	18,88	NS	5,55	5,55
3	19,48	NS	20,42	NS	12,66	12,23
5	16,54	NS	16,12	NS	12,42	8,59
7	18,54	NS	17,74	NS	13,73	11,36
10	16	NS	17,2	NS	9,94	10,01



Ryc. 68. Dializatory polisulfonowe. Istotność statystyczna zmian wartości stężeń IL-6 po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatora w czasie t_0 w porównaniu do stężenia obserwowanego dla nowej błony.

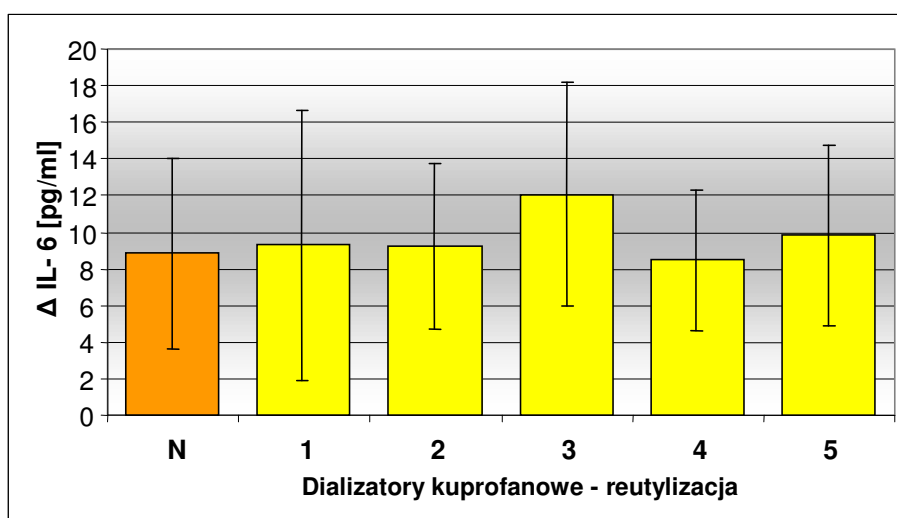


Ryc. 69. Dializatory polisulfonowe. Istotność statystyczna zmian wartości stężeń IL-6 po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatora w czasie t_{120} w porównaniu do stężenia obserwowanego dla nowej błony.

Po przeanalizowaniu wyników zestawionych w tabelach 25 i 26 oraz rycin 66, 67 i 68, 69 zaobserwowano, że wartości stężeń IL-6 po kolejnych krotnościach reutilizacji błony kuprofanowej oraz polisulfonowej nie uległy istotnym statystycznie zmianom ani w czasie t_0 ani w czasie t_{120} , co świadczyło o braku poprawy biogodności błon kuprofanowych oraz o braku wpływu procesu reutilizacji kwasem nadoctowym na wysoką biogodność błon polisulfonowych.

Tab. 27. Dializatory kuprofanowe. Istotność statystyczna zmian stężeń IL-6 (Δ IL-6) po kolejnych reutilizacjach dializatora w porównaniu do Δ IL-6 dla nowej błony.

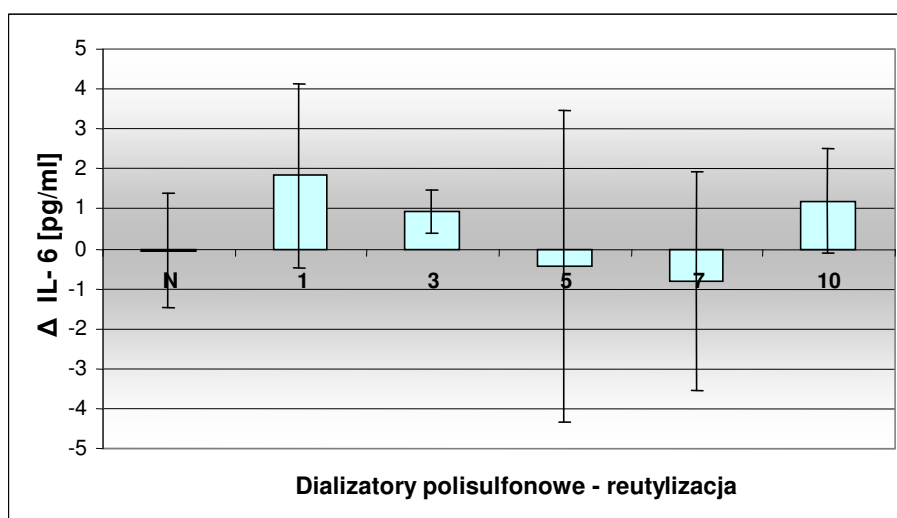
Dializatory Kuprofanowe	Δ IL- 6	SD	min	max	p
N	8,84	5,21	0,3	14,2	xxx
1	9,31	7,37	4,57	22,4	NS
2	9,25	4,53	5	14,17	NS
3	12,07	6,13	5,27	21,87	NS
4	8,47	3,83	2,6	13,2	NS
5	9,82	4,91	4,3	16,8	NS



Ryc. 70. Dializatory kuprofanowe. Istotność statystyczna zmian stężeń IL-6 (Δ IL-6) po kolejnych reutilizacjach dializatora w porównaniu do Δ IL-6 dla nowej błony.

Tab. 28. Dializatory polisulfonowe. Istotność statystyczna zmian stężeń IL-6 (Δ IL-6) po kolejnych reutilizacjach dializatora w porównaniu do Δ IL-6 dla nowej błony.

Dializatory Polisulfonowe	Δ IL- 6	SD	min	max	p
N	-0,06	1,43	-2,3	1,1	xxx
1	1,84	2,3	-0,08	5,5	NS
3	0,94	0,53	0,4	1,5	NS
5	-0,42	3,9	-7,4	1,6	NS
7	-0,8	2,75	-5,6	1,1	NS
10	1,2	1,31	0,2	3,4	NS

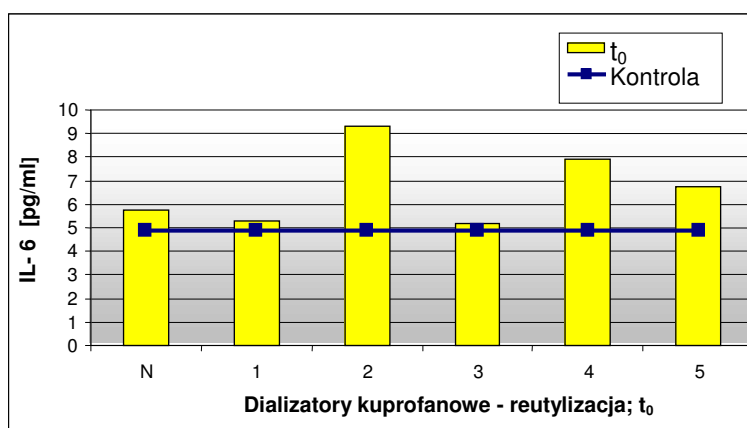


Ryc. 71. Dializatory polisulfonowe. Istotność statystyczna zmian stężeń IL-6 (Δ IL-6) po kolejnych reutilizacjach dializatora w porównaniu do Δ IL-6 dla nowej błony.

Do analizy wprowadzono zmienną, stanowiącą różnicę pomiędzy wartościami stężeń IL-6 oznaczonymi w czasie t_{120} i w czasie t_0 (Δ IL-6). Po przeanalizowaniu tabel 27 i 28 oraz rycin 70 i 71 zaobserwowano, że przyrosty stężeń IL-6 po kolejnych reutilizacjach błony kuprofanowej oraz polisulfonowej w porównaniu do zmiany stężenia IL-6 odnotowanego dla nowych błon – nie osiągnęły istotności statystycznej po żadnej krotności reutilizacji tych dializatorów. Nie uzyskano oczekiwanej poprawy stopnia biogodności błon kuprofanowych poddawanych procesowi reutilizacji kwasem nadooctowym. Reutilizacja dializatorów kuprofanowych kwasem nadooctowym nie wpłynęła w sposób istotny na zmianę stopnia ich biogodności ocenianej metodą monitorowania stężeń IL-6.

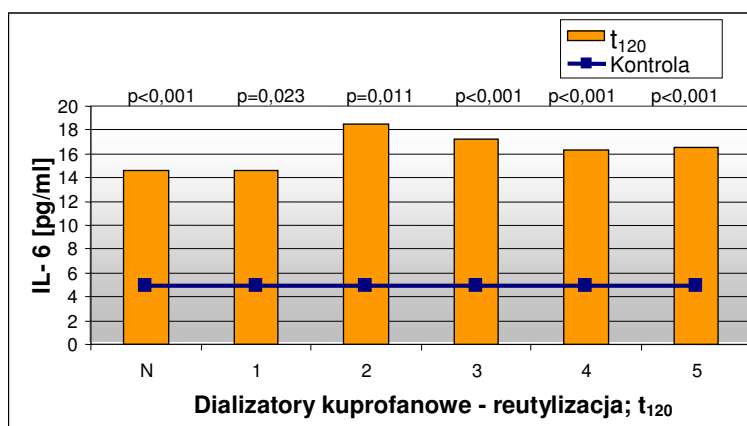
W przypadku dializatorów polisulfonowych reutilizacja kwasem nadooctowym również nie wpłynęła w sposób istotny na zmianę stopnia ich wysokiej biogodności, ocenianej metodą monitorowania stężeń IL-6.

Na rycinach 72 – 75 oraz w tabelach uzupełniających przedstawiono zestawienie średniej wartości stężenia IL-6 uzyskanego w grupie kontrolnej z profilami wydzielania IL-6 (w czasie t_0 i t_{120}) po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatorów kuprofanowych i polisulfonowych.



KUP	t_0	Kontrola	p
N	5,77	4,9	NS
1	5,27	4,9	NS
2	9,29	4,9	NS
3	5,17	4,9	NS
4	7,89	4,9	NS
5	6,77	4,9	NS

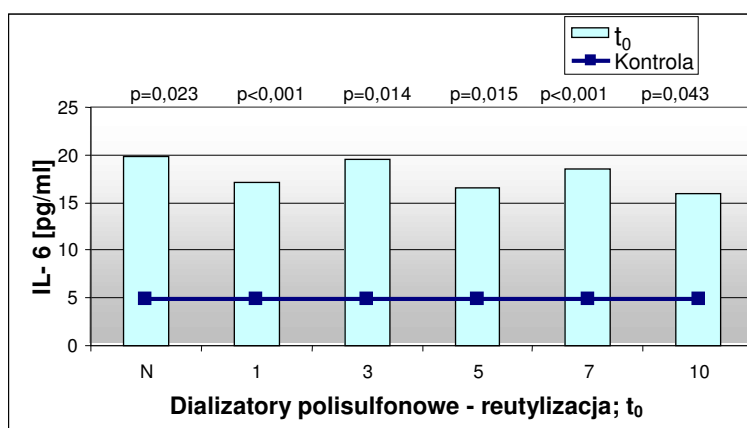
Ryc. 72. Dializatory kuprofanowe. Zestawienie średniej wartości stężenia IL-6 uzyskanego w grupie kontrolnej z profilami wydzielania IL-6 w czasie t_0 po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatorów.



KUP	t_{120}	Kontrola	p
N	14,62	4,9	<0,001
1	14,58	4,9	0,023
2	18,54	4,9	0,011
3	17,24	4,9	<0,001
4	16,36	4,9	<0,001
5	16,59	4,9	<0,001

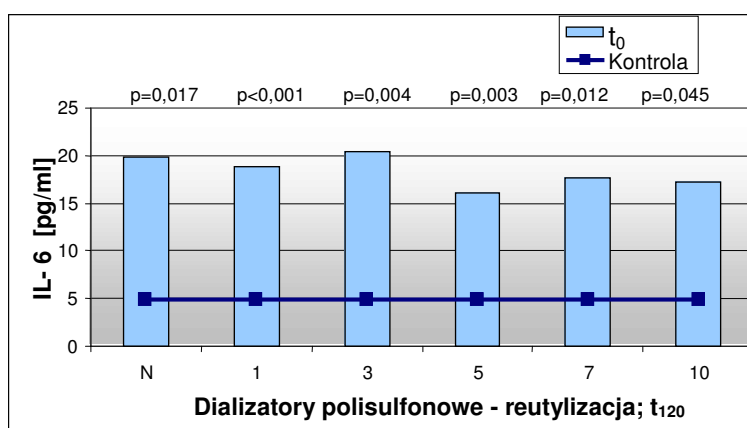
Ryc. 73. Dializatory kuprofanowe. Zestawienie średniej wartości stężenia IL-6 uzyskanego w grupie kontrolnej z profilami wydzielania IL-6 w czasie t_{120} po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatorów.

Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy pomiędzy wartościami stężeń IL-6 w grupie kontrolnej (4,9 pg/ml) a wartościami stężeń IL-6 w czasie t_0 (6,7 pg/ml) w grupie chorych dializowanych przy użyciu dializatorów kuprofanowych. Stwierdzono natomiast statystycznie znamienne różnice ($p < 0,023$) pomiędzy wartościami stężeń IL-6 w grupie kontrolnej (4,9 pg/ml) a wartościami stężeń IL-6 w czasie t_{120} (16,3 pg/ml) w grupie chorych dializowanych przy użyciu dializatorów kuprofanowych, co świadczy o znacznym pobudzeniu układu immunologicznego tych pacjentów (szczególnie PBMC).



PS	t_0	Kontrola	p
N	19,82	4,9	0,023
1	17,04	4,9	<0,001
3	19,48	4,9	0,014
5	16,54	4,9	0,015
7	18,54	4,9	<0,010
10	16	4,9	0,043

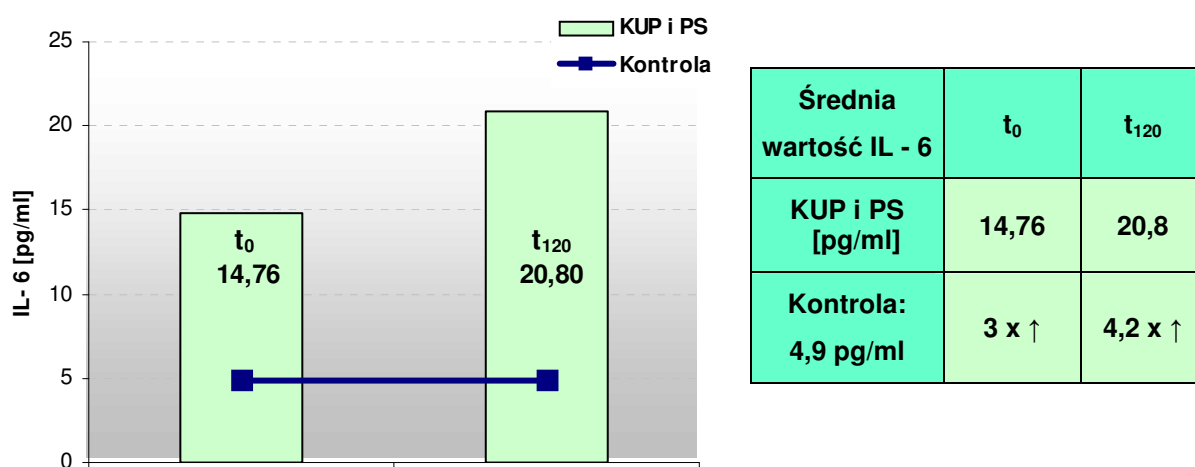
Ryc. 74. Dializatory polisulfonowe. Zestawienie średniej wartości stężenia IL-6 uzyskanego w grupie kontrolnej z profilami wydzielania IL-6 w czasie t_0 po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatorów.



PS	t_{120}	Kontrola	p
N	19,76	4,9	0,017
1	18,88	4,9	<0,001
3	20,42	4,9	0,004
5	16,12	4,9	0,003
7	17,74	4,9	0,012
10	17,2	4,9	0,045

Ryc. 75. Dializatory polisulfonowe. Zestawienie średniej wartości stężenia IL-6 uzyskanego w grupie kontrolnej z profilami wydzielania IL-6 w czasie t_{120} po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatorów.

Stwierdzono statystycznie znamienne różnice ($p < 0,043$) pomiędzy wartościami stężeń IL-6 w grupie kontrolnej (4,9 pg/ml) a wartościami stężeń IL-6 w czasie t_0 (17,9 pg/ml) w grupie chorych dializowanych przy użyciu dializatorów polisulfonowych. Stwierdzono również statystycznie znamienne różnice ($p < 0,045$) pomiędzy wartościami stężeń IL-6 w grupie kontrolnej (4,9 pg/ml) a wartościami stężeń IL-6 w czasie t_{120} (18,4 pg/ml) w grupie chorych dializowanych przy użyciu dializatorów polisulfonowych.

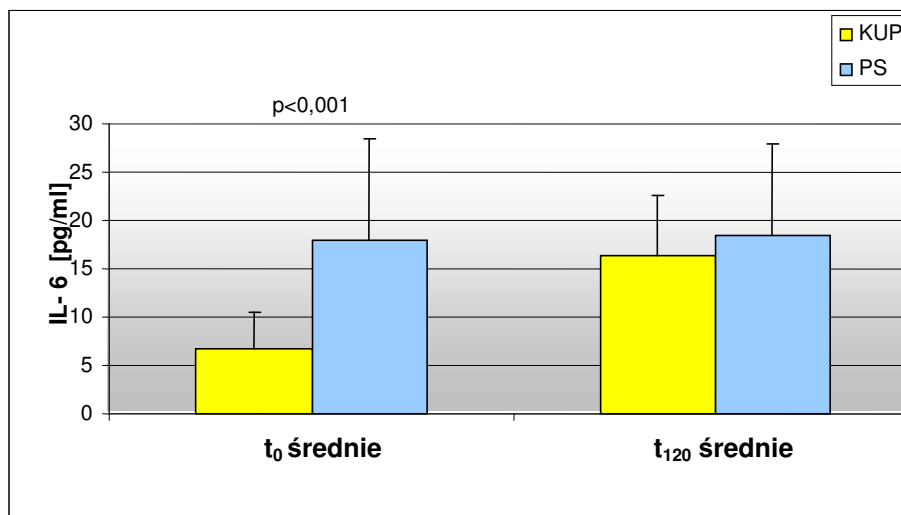


Ryc. 76. Zestawienie uśrednionych wartości stężeń IL-6 uzyskanych w obydwu badanych grupach pacjentów ze średnią wartością IL-6 uzyskaną w grupie kontrolnej.

Średnia wartość IL-6 w grupie kontrolnej wynosiła 4,9 pg/ml, natomiast średnia wartość IL-6 w okresie przed rozpoczęciem HD (w czasie t_0) u wszystkich 10 pacjentów poddanych badaniu była 3 – krotnie większa – wynosiła bowiem 14,7 pg/ml. W drugiej godzinie po rozpoczęciu zabiegu HD (w czasie t_{120}) średnia wartość IL-6 u wszystkich 10 pacjentów poddanych badaniu wynosiła 20,8 pg/ml – zatem była ponad 4 – krotnie większa w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 76).

Tab. 29. Istotność statystyczna różnic w wartościach średnich IL-6 uzyskanych w czasie t_0 i t_{120} pomiędzy badanymi grupami pacjentów dializowanych przy użyciu dializatorów kuprofanowych oraz polisulfonowych.

IL- 6	KUP	PS	Δ IL- 6	p	SD KUP	SD PS
t_0 średnie	6,7	17,9	11,2	< 0,001	3,9	10,6
t_{120} średnie	16,3	18,4	2,1	NS	6,3	9,6



Ryc. 77. Istotność statystyczna różnic w wartościach średnich IL-6 uzyskanych w czasie t_0 i t_{120} pomiędzy badanymi grupami pacjentów dializowanych przy użyciu dializatorów kuprofanowych oraz polisulfonowych.

Dla wszystkich pomiarów stężeń IL-6 uzyskanych w obydwu grupach pacjentów dializowanych przy użyciu błon kuprofanowych oraz polisulfonowych obliczono średnie wartości stężeń IL-6, uzyskanych w czasie t_0 i t_{120} . Następnie zbadano czy istnieją statystycznie znamienne różnice w wartościach średnich IL-6 pomiędzy badanymi grupami. Stwierdzono statystycznie znamienne różnice ($p < 0,001$) pomiędzy średnimi wartościami stężeń IL-6 uzyskanymi w czasie t_0 pomiędzy chorymi dializowanymi przy użyciu błon kuprofanowych (6,7 pg/ml) a chorymi dializowanymi przy użyciu błon polisulfonowych (17,9 pg/ml; tab. 29, ryc. 77). Komentarz dotyczący związku stężeń oznaczanych cytokin z wiekiem chorych zawarto w dyskusji.

Ponieważ w przypadku błon kuprofanowych doszło do istotnego wzrostu stężenia IL-6 w czasie t_{120} przy jednocześnie niewielkim zwiększeniu stężenia tej cytokiny w przypadku błon polisulfonowych, zatem nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic pomiędzy średnimi wartościami stężeń IL-6 uzyskanymi w czasie t_{120} pomiędzy chorymi dializowanymi

przy użyciu błon kuprofanowych (16,3 pg/ml) a chorymi dializowanymi przy użyciu błon polisulfonowych (18,4 pg/ml).

Tab. 30. Błona kuprofanowa. Zestawienie parametrów szorstkości powierzchni wewnętrznej z wartościami stężeń IL-6 w kolejnych użyciach dializatorów.

Błona Kuprofanowa	IL- 6	Parametry szorstkości powierzchni wewnętrznej					
		RMS		BR 20%		BR 80%	
		Reutilizacja	t	wsp. r	istotność	wsp. r	istotność
N	0	-0,09	NS	-0,12	NS	-0,12	NS
	120	0,35	NS	0,31	NS	0,3	NS
1	0	0,08	NS	-0,18	NS	0,1	NS
	120	-0,63	NS	-0,8	NS	-0,45	NS
2	0	0,61	NS	-0,54	NS	-0,56	NS
	120	0,33	NS	-0,05	NS	-0,07	NS
3	0	-0,82	NS	-0,46	NS	-0,43	NS
	120	0,29	NS	0,65	NS	0,68	NS
4	0	0,45	NS	0,4	NS	0,37	NS
	120	0,27	NS	0,21	NS	0,19	NS
5	0	<0,01	NS	-0,09	NS	-0,12	NS
	120	0,25	NS	0,33	NS	0,38	NS

Tab. 31. Błona polisulfonowa. Zestawienie parametrów szorstkości powierzchni wewnętrznej z wartościami stężeń IL-6 w kolejnych użyciach dializatorów.

Błona Polisulfonowa	IL- 6	Parametry szorstkości powierzchni wewnętrznej					
		RMS		BR 20%		BR 80%	
		Reutilizacja	t	wsp. r	istotność	wsp. r	istotność
N	0	-0,85	NS	-0,97	p<0,05	-0,98	p<0,05
	120	-0,79	NS	-0,94	p<0,05	-0,98	p<0,05
1	0	0,36	NS	0,31	NS	0,37	NS
	120	0,07	NS	<0,01	NS	0,06	NS
3	0	-0,39	NS	-0,43	NS	-0,38	NS
	120	-0,41	NS	-0,45	NS	-0,4	NS
5	0	-0,2	NS	-0,32	NS	-0,41	NS
	120	-0,22	NS	-0,34	NS	-0,43	NS
7	0	-0,38	NS	-0,35	NS	-0,29	NS
	120	-0,3	NS	-0,25	NS	-0,19	NS
10	0	0,6	NS	0,61	NS	0,69	NS
	120	0,68	NS	0,68	NS	0,75	NS

Nie znaleziono oczekiwanej korelacji pomiędzy wartościami parametrów szorstkości powierzchni wewnętrznej błon kuprofanowej i polisulfonowej (RMS, BR20%; BR80%) w kolejnych krotnościach ich reutilizacji a profilem wydzielania IL-6 oznaczanej w surowicy chorych hemodializowanych w czasie t_0 i t_{120} , za wyjątkiem wyników uzyskanych dla nowej błony polisulfonowej (t_0 i t_{120}), gdzie dla BR 20% i BR 80% uzyskano korelację odwrotną (zależność odwrotnie proporcjonalną). Należy przypuszczać, że jest to zbieg okoliczności, ponieważ nie znaleziono związku pomiędzy wartością RMS dla nowej błony a wartościami IL-6 oznaczanymi niezależnie.

Zestawiając uzyskane wyniki parametrów opisujących szorstkość powierzchni (RMS, BR) z wynikami zmian stężenia IL-6 podczas dializy stwierdzono brak korelacji pomiędzy badanymi parametrami.

Analizując dużą, gdyż blisko dwudziestokrotną różnicę w średnim przyroście stężenia IL-6 u chorych dializowanych przy użyciu błon kuprofanowych w porównaniu do chorych dializowanych przy użyciu błon polisulfonowych i jednocześnie biorąc pod uwagę niewielką różnicę w parametrach szorstkości tych kapilar, ponadto odwrotną do różnicy w pobudzeniu układu immunologicznego pacjenta, można stwierdzić **brak, lub co najwyżej słaby związek pomiędzy szorstkością powierzchni błony a jej biogodnością**, co - w założeniu pracy - miało być jedną z głównych przyczyn pobudzających reakcje immunologiczne pacjenta [20].

4.3.3.2. Czynniki martwicy nowotworów α (TNF α)

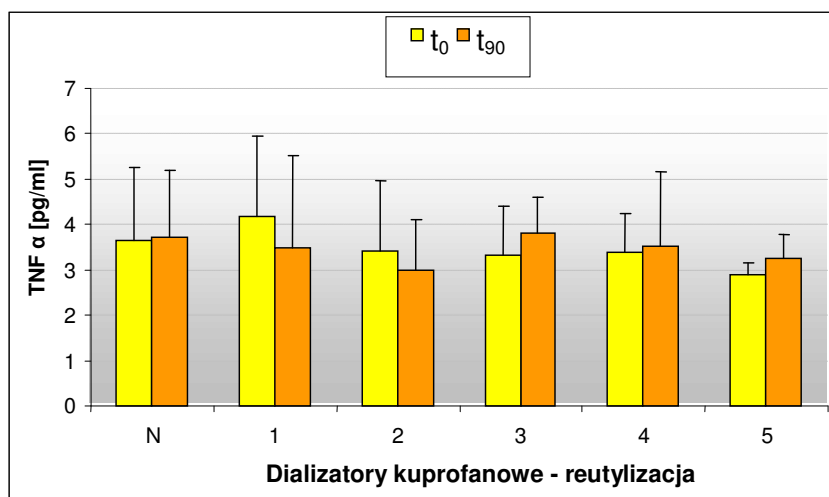
W badaniu analizowano zmiany stężenia TNF α (w czasie $t_0 \rightarrow t_{90}$) po kolejnych krotnościach użycia dializatorów, porównując stężenia TNF α obserwowane po kolejnych reutilizacjach z wartościami pierwotnymi, obserwowanymi podczas stosowania nowych błon (N). Porównania przeprowadzono dla pełnych profili obserwacji TNF α zarówno dla błon kuprofanowych jak i polisulfonowych.

t_0 – stężenia TNF α przed rozpoczęciem HD

t_{90} – stężenia TNF α w 90 minucie trwania HD

Tab. 32. Dializatory kuprofanowe. Zmiany wartości stężeń TNF α w trakcie dializy na nowym oraz 1, 2, 3, 4, 5 - krotnie reutilizowanym dializatorze.

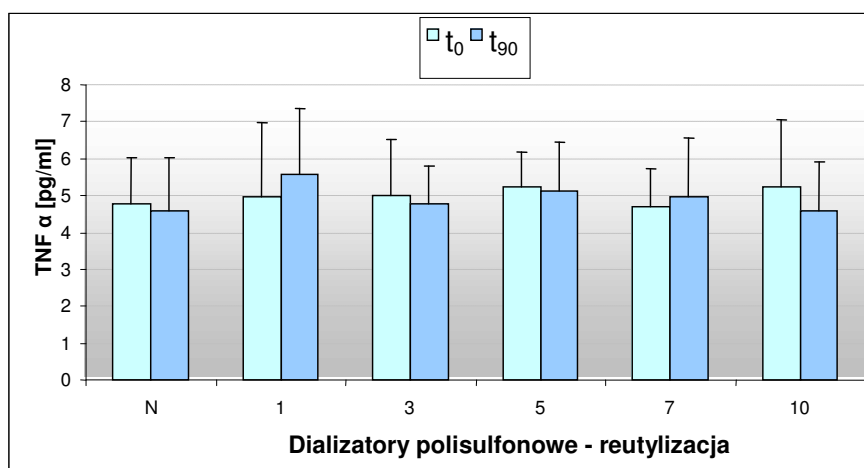
Dializatory Kuprofanowe	t_0	SD	t_{90}	SD	p	Delta
N	3,66	1,59	3,7	1,48	NS	0,04
1	4,16	1,78	3,48	2,03	NS	-0,68
2	3,42	1,54	3	1,12	NS	-0,42
3	3,32	1,08	3,8	0,81	NS	0,48
4	3,4	0,83	3,52	1,65	NS	0,12
5	2,88	0,29	3,26	0,51	NS	0,38



Ryc. 78. Dializatory kuprofanowe. Zmiany wartości stężeń TNF α w trakcie dializy na nowym oraz 1, 2, 3, 4, 5 - krotnie reutilizowanym dializatorze.

Tab. 33. Dializatory polisulfonowe. Zmiany wartości stężeń TNF α w trakcie dializy na nowym oraz 1, 3, 5, 7, 10 - krotnie reużyłowanym dializatorze.

Dializatory Polisulfonowe	t ₀	SD	t ₉₀	SD	p	delta
N	4,78	1,25	4,6	1,42	NS	-0,18
1	4,96	2	5,58	1,79	NS	0,62
3	5	1,51	4,76	1,03	NS	-0,24
5	5,24	0,94	5,1	1,33	NS	-0,14
7	4,72	0,99	4,96	1,61	NS	0,24
10	5,24	1,81	4,6	1,32	NS	-0,64

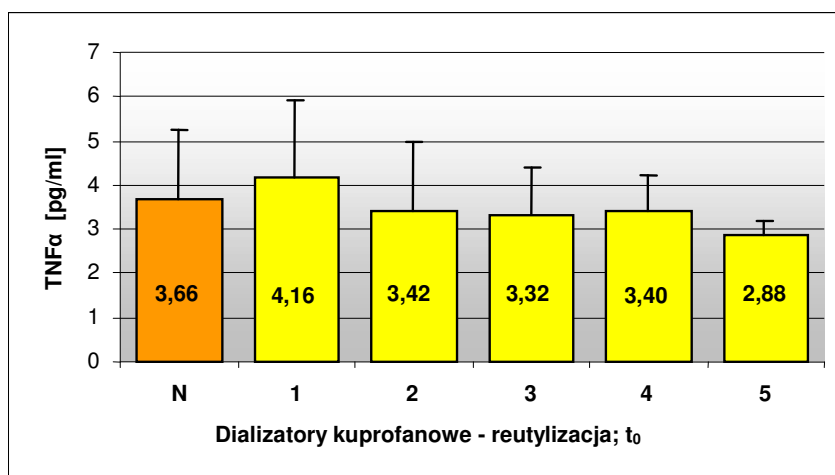


Ryc. 79. Dializatory polisulfonowe. Zmiany wartości stężeń TNF α w trakcie dializy na nowym oraz 1, 3, 5, 7, 10 - krotnie reużyłowanym dializatorze.

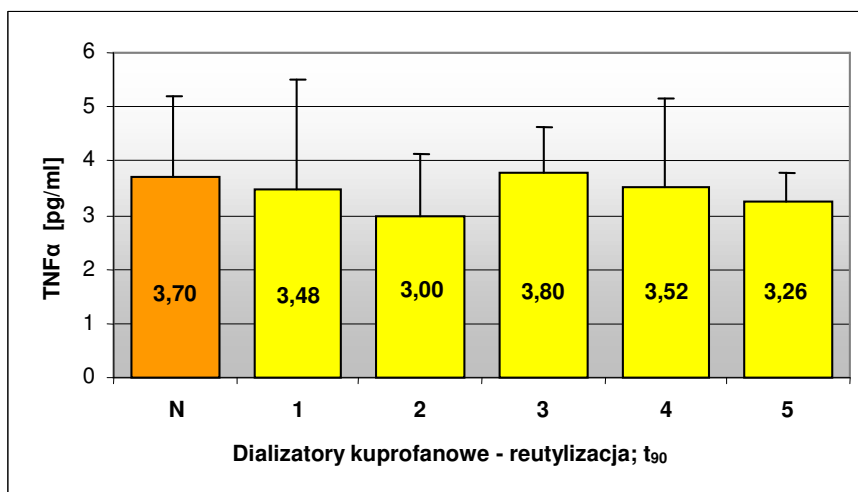
Przyrost TNF α w trakcie dializy na nowym oraz 1, 2, 3, 4, 5 - krotnie reużyłowanym dializatorze kuprofanowym oraz nowym oraz 1, 3, 5, 7, 10 - krotnie reużyłowanym dializatorze polisulfonowym nie osiągnął znaczącości statystycznej w żadnej krotności użycia wymienionych dializatorów (tab. 32, 33; ryc. 78, 79).

Tab. 34. Dializatory kuprofanowe. Istotność statystyczna zmian wartości stężeń TNF α po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatora w czasie t_0 oraz t_{90} w porównaniu do stężenia obserwowanego dla nowej błony.

Dializatory Kuprofanowe	t_0	p	t_{90}	p	SD t_0	SD t_{90}
N	3,66	xxx	3,7	xxx	1,59	1,48
1	4,16	NS	3,48	NS	1,78	2,03
2	3,42	NS	3	NS	1,54	1,12
3	3,32	NS	3,8	NS	1,08	0,81
4	3,4	NS	3,52	NS	0,83	1,65
5	2,88	NS	3,26	NS	0,29	0,51



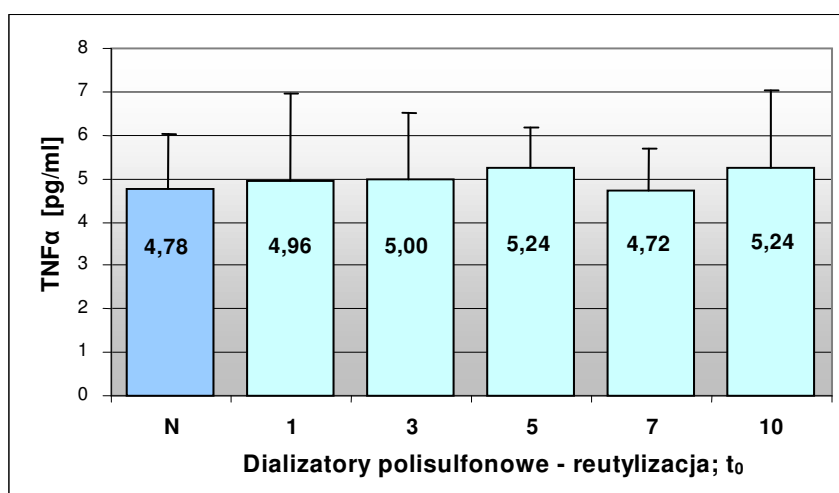
Ryc. 80. Dializatory kuprofanowe. Istotność statystyczna zmian wartości stężeń TNF α po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatora w czasie t_0 w porównaniu do stężenia obserwowanego dla nowej błony.



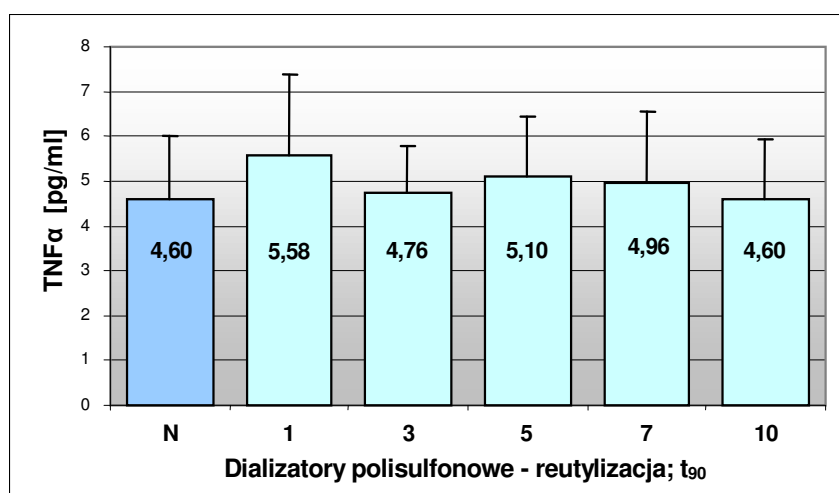
Ryc. 81. Dializatory kuprofanowe. Istotność statystyczna zmian wartości stężeń TNF α po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatora w czasie t_{90} w porównaniu do stężenia obserwowanego dla nowej błony.

Tab. 35. Dializatory polisulfonowe. Istotność statystyczna zmian wartości stężeń TNF α po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatora w czasie t_0 oraz t_{90} w porównaniu do stężenia obserwowanego dla nowej błony.

Dializatory Polisulfonowe	t_0	p	t_{90}	p	SD t_0	SD t_{90}
N	4,78	xxx	4,6	xxx	1,25	1,42
1	4,96	NS	5,58	NS (0,111)	2	1,79
3	5	NS	4,76	NS	1,51	1,03
5	5,24	NS	5,1	NS	0,94	1,33
7	4,72	NS	4,96	NS	0,99	1,61
10	5,24	NS	4,6	NS	1,81	1,32



Ryc. 82. Dializatory polisulfonowe. Istotności statystyczna zmian wartości stężeń TNF α po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatora w czasie t_0 w porównaniu do stężenia obserwowanego dla nowej błony.

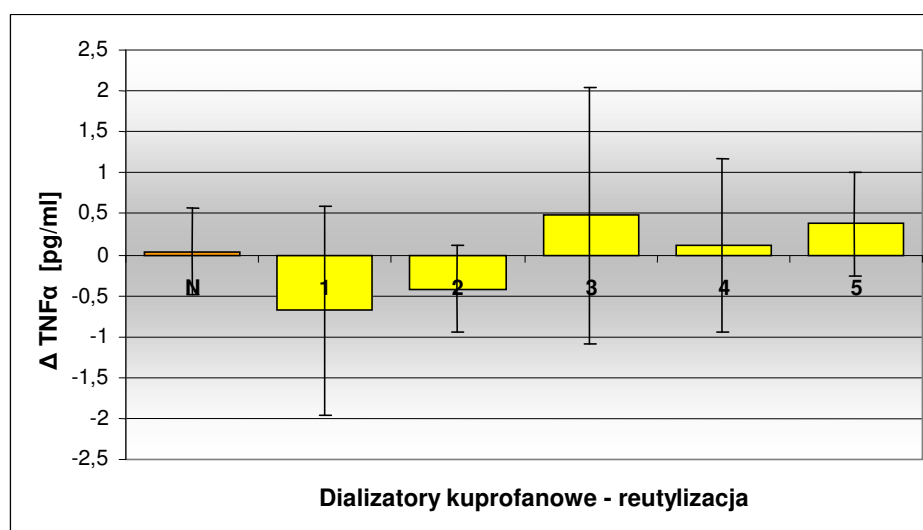


Ryc. 83. Dializatory polisulfonowe. Istotności statystyczna zmian wartości stężeń TNF α po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatora w czasie t_{90} w porównaniu do stężenia obserwowanego dla nowej błony.

Po przeanalizowaniu wyników zestawionych w tabelach 34 i 35 oraz rycin 80, 81 i 82, 83 zaobserwowano, że wartości stężeń TNF α w kolejnych krotnościach reutilizacji błony kuprofanowej oraz polisulfonowej nie ulegały istotnym statystycznie zmianom ani w czasie t₀ ani w czasie t₉₀, co świadczy o braku wpływu procesu reutilizacji kwasem nadctowym na stopień biogodności badanych błon.

Tab. 36. Dializatory kuprofanowe. Istotność statystyczna zmian stężeń TNF α (Δ TNF α) po kolejnych reutilizacjach dializatora w porównaniu do Δ TNF α dla nowej błony.

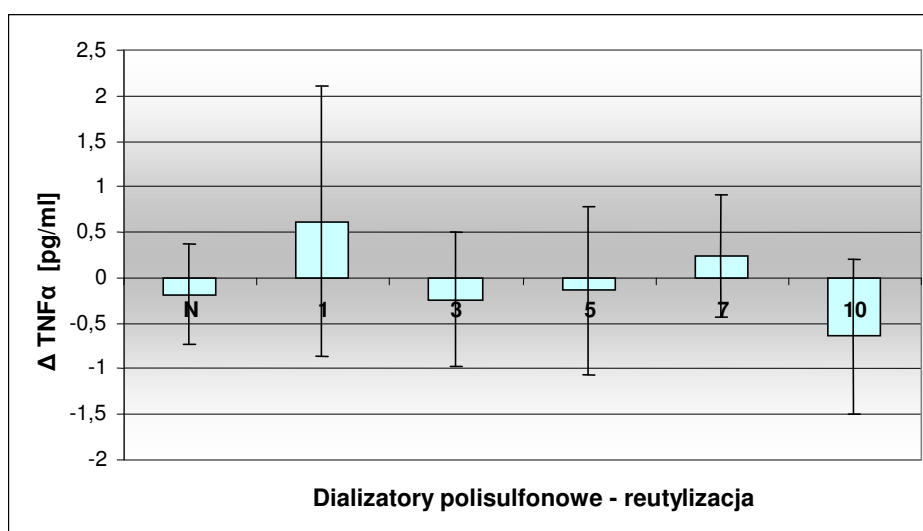
Dializatory Kuprofanowe	Δ TNF α	SD	min	max	p
N	0,04	0,53	-0,5	0,9	xxx
1	-0,68	1,28	-2,0	0,6	NS
2	-0,42	0,53	-1,3	0	NS
3	0,48	1,56	-1,1	2,5	NS
4	0,12	1,06	-0,6	2	NS
5	0,38	0,63	-0,6	1,1	NS



Ryc. 84. Dializatory kuprofanowe. Istotność statystyczna zmian stężeń TNF α (Δ TNF α) po kolejnych reutilizacjach dializatora w porównaniu do Δ TNF α dla nowej błony.

Tab. 37. Dializatory polisulfonowe. Istotność statystyczna zmian stężeń TNF α (Δ TNF α) po kolejnych reutilizacjach dializatora w porównaniu do Δ TNF α dla nowej błony.

Dializatory Polisulfonowe	Δ TNF α	SD	min	max	p
N	-0,18	0,55	-0,7	0,5	xxx
1	0,62	1,49	-1,6	2	NS
3	-0,24	0,74	-1,5	0,3	NS
5	-0,14	0,92	-1,6	0,6	NS
7	0,24	0,67	-0,4	1,2	NS
10	-0,64	0,85	-1,6	0,7	NS



Ryc. 85. Dializatory polisulfonowe. Istotności statystyczna zmian stężeń TNF α (Δ TNF α) po kolejnych reutilizacjach dializatora w porównaniu do Δ TNF α dla nowej błony.

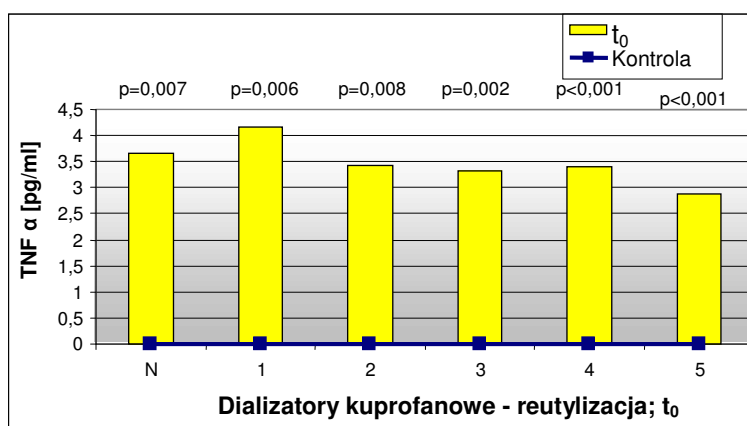
Do analizy wprowadzono nową zmienną, stanowiącą różnicę pomiędzy wartościami stężeń TNF α oznaczonymi w czasie t_{90} i w czasie t_0 (delta – Δ TNF α).

Po przeanalizowaniu tabel 36 i 37 oraz rycin 84 i 85 zaobserwowano, że zmiany stężeń TNF α obserwowane po kolejnych reutilizacjach błony kuprofanowej oraz polisulfonowej w porównaniu do zmiany stężenia TNF α obserwowanego dla nowych błon – nie osiągnęły istotności statystycznej po żadnej krotności reutilizacji tych dializatorów.

Nie uzyskano oczekiwanej poprawy stopnia biogodności błon kuprofanowych poddawanych reutilizacji kwasem nadooctowym. Reutilizacja dializatorów kuprofanowych kwasem nadooctowym nie wpłynęła w sposób istotny na zmianę stopnia ich biogodności, ocenianej metodą monitorowania stężeń TNF α .

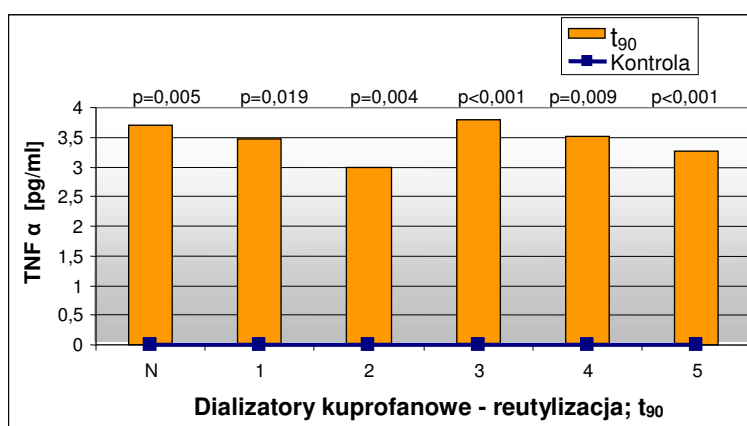
W przypadku dializatorów polisulfonowych reutilizacja kwasem nadoctowym również nie wpłynęła w sposób istotny na zmianę stopnia ich wysokiej biogodności, ocenianej metodą monitorowania stężeń TNF α .

Na rycinach 86 - 89 oraz w tabelach uzupełniających przedstawiono zestawienie średniej wartości stężenia TNF α uzyskanego w grupie kontrolnej z profilami wydzielania TNF α (w czasie t_0 i t_{90}) po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatorów kuprofanowych i polisulfonowych.



KUP	t_0	Kontrola	p
N	3,66	0	0,007
1	4,16	0	0,006
2	3,42	0	0,008
3	3,32	0	0,002
4	3,4	0	<0,001
5	2,88	0	<0,001

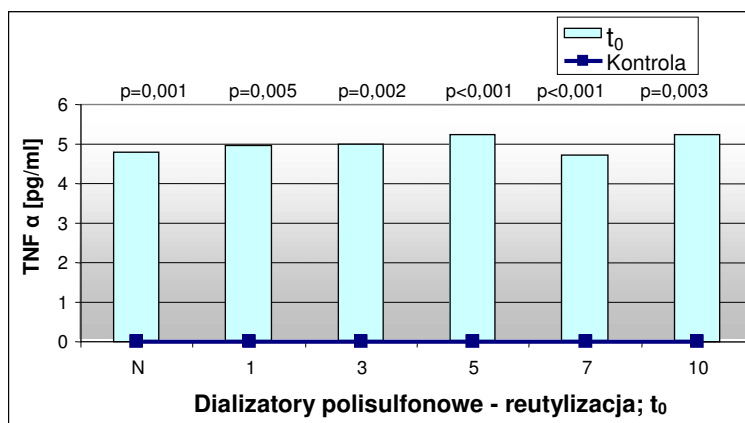
Ryc. 86. Dializatory kuprofanowe. Zestawienie średniej wartości stężenia TNF α uzyskanego w grupie kontrolnej z profilami wydzielania TNF α w czasie t_0 po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatorów.



KUP	t_{90}	Kontrola	p
N	3,7	0	0,005
1	3,48	0	0,019
2	3	0	0,004
3	3,8	0	<0,001
4	3,52	0	0,009
5	3,26	0	<0,001

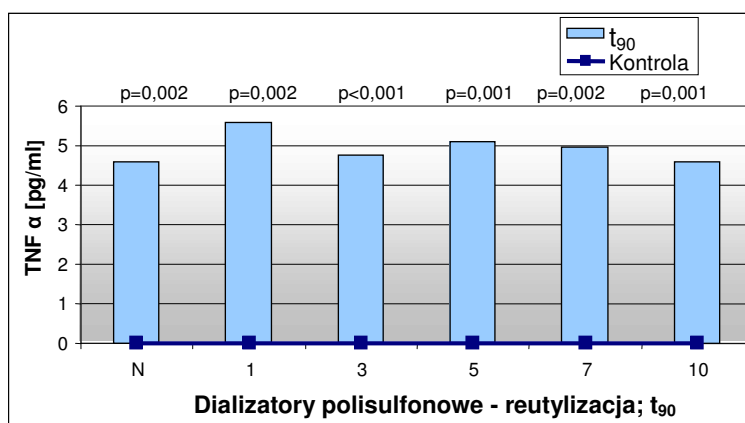
Ryc. 87. Dializatory kuprofanowe. Zestawienie średniej wartości stężenia TNF α uzyskanego w grupie kontrolnej z profilami wydzielania TNF α w czasie t_{90} po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatorów.

Stwierdzono statystycznie znamienne różnice ($p < 0,008$) pomiędzy wartościami stężeń TNF α w grupie kontrolnej (0,00 pg/ml) a wartościami stężeń TNF α w czasie t_0 (3,47 pg/ml) w grupie chorych dializowanych przy użyciu dializatorów kuprofanowych. Ponadto stwierdzono statystycznie znamienne różnice ($p < 0,019$) pomiędzy wartościami stężeń TNF α w grupie kontrolnej (0,00 pg/ml) a wartościami stężeń TNF α w czasie t_{90} (3,46 pg/ml) w grupie chorych dializowanych przy użyciu dializatorów kuprofanowych.



PS	t_0	Kontrola	p
N	4,78	0	0,001
1	4,96	0	0,005
3	5	0	0,002
5	5,24	0	<0,001
7	4,72	0	<0,001
10	5,24	0	0,003

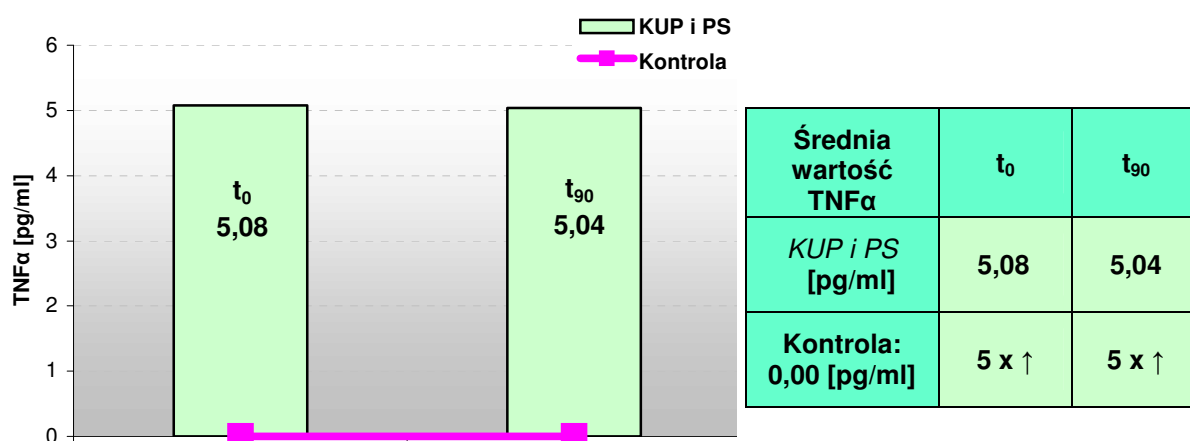
Ryc. 88. Dializatory polisulfonowe. Zestawienie średniej wartości stężenia TNF α uzyskanego w grupie kontrolnej z profilami wydzielania TNF α w czasie t_0 po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatorów.



PS	t_{90}	Kontrola	p
N	4,6	0	0,002
1	5,58	0	0,002
3	4,76	0	<0,001
5	5,1	0	0,001
7	4,96	0	0,002
10	4,6	0	0,001

Ryc. 89. Dializatory polisulfonowe. Zestawienie średniej wartości stężenia TNF α uzyskanego w grupie kontrolnej z profilami wydzielania TNF α w czasie t_{90} po kolejnych krotnościach reutilizacji dializatorów.

Stwierdzono statystycznie znamienne różnice ($p < 0,005$) pomiędzy wartościami stężeń TNF α w grupie kontrolnej (0,00 pg/ml) a wartościami stężeń TNF α w czasie t_0 (4,99 pg/ml) w grupie chorych dializowanych przy użyciu dializatorów polisulfonowych. Statystycznie znamienne różnice stwierdzono ($p < 0,002$) pomiędzy wartościami stężeń TNF α w grupie kontrolnej (0,00 pg/ml) a wartościami stężeń TNF α w czasie t_{90} (4,93 pg/ml) w grupie chorych dializowanych przy użyciu dializatorów polisulfonowych.

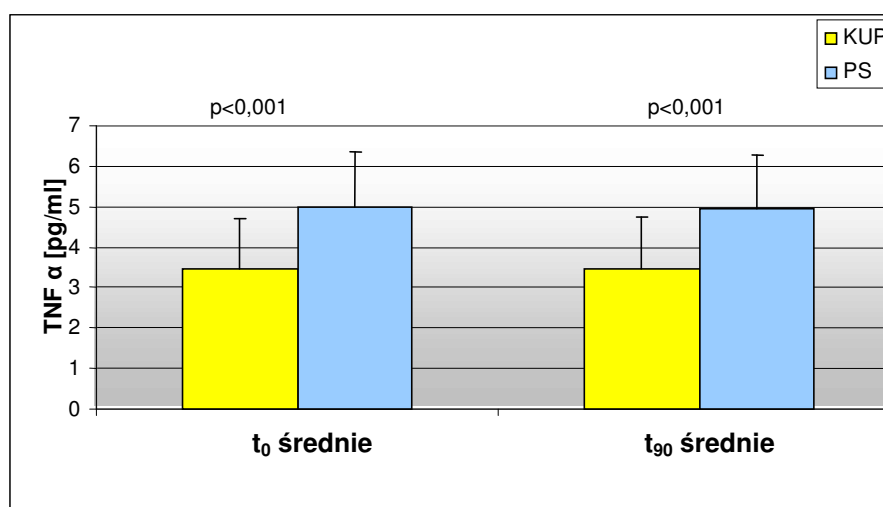


Ryc. 90. Zestawienie uśrednionych wartości stężeń TNF α uzyskanych w obydwu badanych grupach pacjentów ze średnią wartością TNF α uzyskaną w grupie kontrolnej.

Średnia wartość TNF α w grupie kontrolnej wynosiła 0,00 pg/ml, natomiast średnia wartość TNF α w okresie przed rozpoczęciem HD (czas t_0) u wszystkich 10 pacjentów poddanych badaniu była około 5 – krotnie większa – wynosiła bowiem 5,08 pg/ml. W 90. minucie od rozpoczęcia zabiegu HD (czas t_{90}) średnia wartość TNF α u wszystkich 10 pacjentów poddanych badaniu wynosiła 5,04 pg/ml – zatem również była 5 – krotnie większa w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 90).

Tab. 38. Istotność statystyczna różnic w wartościach średnich TNF α uzyskanych w czasie t₀ i t₉₀ pomiędzy badanymi grupami pacjentów dializowanych przy użyciu dializatorów kuprofanowych oraz polisulfonowych.

TNF α	KUP	PS	Δ TNF α	p	SD KUP	SD PS
t ₀ średnie	3,47	4,99	1,52	<0,001	1,24	1,36
t ₉₀ średnie	3,46	4,93	1,47	<0,001	1,27	1,35



Ryc. 91. Istotność statystyczna różnic w wartościach średnich TNF α uzyskanych w czasie t₀ i t₉₀ pomiędzy badanymi grupami pacjentów dializowanych przy użyciu dializatorów kuprofanowych oraz polisulfonowych.

Dla wszystkich pomiarów stężeń TNF α uzyskanych w obydwu grupach pacjentów dializowanych przy użyciu błon kuprofanowych oraz polisulfonowych obliczono średnie wartości stężeń TNF α uzyskanych w czasie t₀ i t₉₀. Następnie zbadano, czy istnieją statystycznie znamienne różnice w wartościach średnich TNF α pomiędzy badanymi grupami? Stwierdzono statystycznie znamienne różnice (p < 0,001) pomiędzy średnimi wartościami stężeń TNF α uzyskanymi w czasie t₀ pomiędzy chorymi dializowanymi przy użyciu błon kuprofanowych (3,47 pg/ml) a chorymi dializowanymi przy użyciu błon polisulfonowych (4,99 pg/ml).

Podobnie, stwierdzono statystycznie znamienne różnice (p < 0,001) pomiędzy średnimi wartościami stężeń TNF α uzyskanymi w czasie t₉₀ pomiędzy chorymi dializowanymi przy użyciu błon kuprofanowych (3,46 pg/ml) a chorymi dializowanymi przy użyciu błon polisulfonowych (4,93 pg/ml; tab. 38, ryc. 91).

Należy przypuszczać, że różnice w stężeniu TNF α w czasie t_0 (podobnie jak w przypadku IL-6) mogą wynikać ze znacznej różnicy wiekowej pomiędzy badanymi grupami chorych (średnia wieku chorych dializowanych przy użyciu błon kuprofanowych: 18 lat; średnia wieku chorych dializowanych przy użyciu błon polisulfonowych: 54,2 lat). Ta różnica utrzymała się w czasie t_{90} , gdyż w żadnej z grup badanych pacjentów nie doszło do istotnej zmiany stężenia tej cytokiny w porównaniu do czasu t_0 .

Tab. 39. Błona kuprofanowa. Zestawienie parametrów szorstkości powierzchni wewnętrznej z wartościami stężeń TNF α w kolejnych użyciach dializatorów.

Błona kuprofanowa	TNF α	Parametry szorstkości powierzchni wewnętrznej					
		RMS		BR 20%		BR 80%	
		wsp. r	istotność	wsp. r	istotność	wsp. r	istotność
Reutilizacja	t						
N	0	-0,175	NS	-0,119	NS	-0,104	NS
	90	-0,193	NS	-0,121	NS	-0,102	NS
1	0	0,855	0,06	0,943	0,02	0,946	0,01
	90	0,626	NS	0,651	NS	0,92	0,03
2	0	-0,011	NS	-0,273	NS	-0,278	NS
	90	0,18	NS	-0,423	NS	-0,43	NS
3	0	-0,027	NS	-0,194	NS	-0,208	NS
	90	0,779	0,12	-0,739	0,15	-0,727	0,16
4	0	-0,621	NS	-0,584	NS	-563	NS
	90	-0,412	NS	-0,389	NS	-0,386	NS
5	0	0,355	NS	0,52	NS	0,609	NS
	90	-0,836	0,08	-0,785	0,12	-0,737	0,16

Tab. 40. Błona polisulfonowa. Zestawienie parametrów szorstkości powierzchni wewnętrznej z wartościami stężeń TNF α w kolejnych użyciach dializatorów.

Błona polisulfonowa	TNF α	Parametry szorstkości powierzchni wewnętrznej					
		RMS		BR 20%		BR 80%	
		wsp. r	istotność	wsp. r	istotność	wsp. r	istotność
Reutilizacja	t						
N	0	0,056	NS	-0,062	NS	-0,156	NS
	90	0,341	NS	0,138	NS	-0,02	NS
1	0	0,187	NS	0,083	NS	-0,08	NS
	90	0,288	NS	0,072	NS	-0,128	NS
3	0	0,324	NS	0,395	NS	0,288	NS
	90	0,315	NS	0,514	NS	0,441	NS
5	0	0,009	NS	0,11	NS	0,209	NS
	90	-0,111	NS	0,033	NS	0,072	NS
7	0	0,244	NS	0,023	NS	-0,155	NS
	90	0,113	NS	-0,081	NS	-0,229	NS
10	0	-0,366	NS	-0,345	NS	-0,456	NS
	90	-0,54	NS	-0,477	NS	-0,519	NS

Nie znaleziono spodziewanej korelacji pomiędzy parametrami szorstkości powierzchni wewnętrznej błony kuprofanowej i polisulfonowej (RMS, BR20%; BR80%) w kolejnych krotnościach reutilizacji a profilem wydzielania TNF α oznaczanego w surowicy chorych hemodializowanych w czasie t_0 i t_{90} .

Zestawiając uzyskane wyniki parametrów opisujących szorstkość powierzchni (RMS, BR) z wynikami zmian stężenia TNF α podczas dializy, można stwierdzić brak korelacji pomiędzy badanymi parametrami.

Na podstawie przedstawionych powyżej wyników należy wnioskować, że **reutilizacja dializatorów kwasem nadoctowym nie wpływa w sposób istotny na zmianę nanostruktury powierzchni badanych błon a także nie poprawia stopnia ich biogodności ocenianej metodą monitorowania stężeń IL-6 i TNF α .**

5. DYSKUSJA WYNIKÓW

5.1. OCENA POWIERZCHNI BŁON DIALIZACYJNYCH TECHNIKĄ AFM. OMÓWIENIE UZYSKANYCH WYNIKÓW

Utrzymanie homeostazy ustroju przez nerki jest procesem niezwykle złożonym. Zastąpienie w pełni czynności własnych nerek poprzez hemodializę nie jest w chwili obecnej możliwe z wielu powodów. Jednym z nich jest niedoskonałość błony dializacyjnej odgrywającej najważniejszą rolę w całokształcie procesu oczyszczania i odwadniania. Rodzaj zastosowanej błony dializacyjnej jest bezsprzecznie jednym z najistotniejszych elementów decydującym o skuteczności zabiegu hemodializy.

Rodzaj reakcji biochemicznych zachodzących w momencie kontaktu krwi pacjenta z kapilarą dializatora determinowany jest przez liczne własności samej błony. Zarówno szorstkość powierzchni wewnętrznej błony jak i skład chemiczny kapilary (czyli rodzaje grup funkcyjnych) kontaktującej się z krwią chorego są głównymi determinantami biozgodności oraz charakterystyki funkcjonalnej dializatora. Adhezja komórek (głównie płytek krwi i leukocytów) oraz licznych białek na powierzchni błony dializacyjnej odbywa się zarówno na drodze fizycznych jak i chemicznych oddziaływań [20].

Tsunoda i wsp. badali wpływ szorstkości powierzchni błony (ocenianej techniką AFM) pięciu rodzajów błon celulozowych na stopień adhezji płytek krwi [179]. W cytowanej pracy wykazano, że w przypadku błon charakteryzujących się większym stopniem szorstkości dochodziło do większej adhezji płytek krwi a same błony były mniej biozgodne, natomiast kapilary o gładkich powierzchniach cechowały się mniejszym nasileniem trombogenezy i większym stopniem biozgodności.

W badaniach własnych wykazano, że szorstkość powierzchni wewnętrznej błony polisulfonowej (średnia wartość RMS: 8,7 nm) była większa w porównaniu do powierzchni wewnętrznej błony kuprofanowej (średnia wartość RMS: 4,1 nm). Powołując się na wyniki uzyskane przez Tsunodę i wsp. można by wysnuć fałszywe wnioski o większej biozgodności błony kuprofanowej [179]. Wyniki pracy oczywiście nie potwierdzają takiej korelacji, ponieważ decydującym o biozgodności błony dializacyjnej czynnikiem jest przede wszystkim skład chemiczny materiałów, z których wykonano kapilary, a szczególnie struktura chemiczna warstwy mającej bezpośredni kontakt z krwią pacjenta. Szorstkość powierzchni kontaktującej się z krwią chorego odgrywa również bardzo istotną rolę, niemniej jednak w

przypadku wartości RMS kształtujących się na poziomie 8,7 nm i 4,1 nm parametr ten nie jest na tyle znaczący, aby mógł wpłynąć na stopień biozgodności błon.

Natomiast analizując wartości parametrów szorstkości powierzchni zewnętrznej błon kuprofanowych i polisulfonowych można zauważyć znacznie większą szorstkość (czyli porowatość) błony polisulfonowej (średnia wartość RMS powierzchni zewnętrznej: 36,8 nm) w porównaniu do błony kuprofanowej (średnia wartość RMS powierzchni zewnętrznej: 3,4 nm). Wraz ze wzrostem wartości RMS wiąże się zwiększenie pola powierzchni, co między innymi może tłumaczyć fakt doskonałej adsorpcji endotoksyn bakteryjnych z dializatu na powierzchni zewnętrznej błony polisulfonowej oraz brak takiej możliwości w przypadku błony kuprofanowej. Ponadto, porównując wartości RMS błony polisulfonowej (RMS powierzchni wewnętrznej – 8,7 nm i RMS powierzchni zewnętrznej – 36,8 nm) – wyraźnie uwidacznia się asymetryczna nanostruktura tej błony, czego nie można stwierdzić analizując analogiczne wartości symetrycznej błony kuprofanowej: (RMS powierzchni wewnętrznej – 4,1 nm i RMS powierzchni zewnętrznej – 3,4 nm).

Brak trendu zmian szorstkości powierzchni badanych błon po kolejnych reutilizacjach można tłumaczyć faktem, iż reutilizację prowadzono przy wykorzystaniu kwasu nadoctowego, który w przeciwieństwie do podchlorynu sodu, wypłukującego PVP z polimeru polisulfonowego oraz niszczącego strukturę błon kuprofanowych na skutek chemicznej reakcji pomiędzy ługiem a celulozą, nie naruszał struktury chemicznej badanych błon dializacyjnych.

Uzyskane w niniejszej pracy wartości współczynnika zmienności powierzchni wewnętrznej nowej błony kuprofanowej (V% - 111%) oraz znaczne zróżnicowanie tego parametru po kolejnych użyciach dializatora (od 11% do 112%) może świadczyć o braku jednorodności i powtarzalności nanostruktury tej błony, ocenianej na podstawie pomiarów szorstkości kapilar pobieranych z różnych części pęczka dializatora, a także o ich bardzo znacznej podatności na czynniki zewnętrzne, wymuszone warunkami pracy dializatorów (TMP, Q_B, Q_D) oraz samym procesem reutilizacji. Fakt ten może rzutować na zmianę charakterystyki parametrów błon kuprofanowych, co nie tylko skutkuje dostarczeniem choremu niewystarczającej dawki dializy, lecz także zmniejsza bezpieczeństwo, przewidywalność i biozgodność zabiegu hemodializy.

Z kolei stabilne wartości współczynników zmienności powierzchni wewnętrznej nowej (V% - 30%) i reutilizowanej błony polisulfonowej (od 28% do 58%) mogą świadczyć o większej jednorodności i powtarzalności nanostruktury tej błony oraz o mniejszej jej podatności na czynniki zewnętrzne związane z użytkowaniem tych dializatorów w normalnych warunkach klinicznych. Stabilny parametr współczynnika zmienności błony polisulfonowej zapewnia

bardziej przewidywalne i jednolite warunki prowadzonej dializy, gwarantuje dostarczenie choremu pożądanej dawki dializy oraz bezpieczeństwo i maksymalną biogodność samego zabiegu. Idea wielokrotnego i jednocześnie bezpiecznego wykorzystywania dializatorów leżała u podstaw tworzenia błony polisulfonowej.

Niezwykle złożoną problematykę charakterystyki strukturalnej i funkcjonalnej błony dializacyjnej oraz kwestię stopnia biogodności dializatorów szeroko i wielopłaszczyznowo potraktowali Matsuda i wsp. którzy udowodnili w swojej pracy, że nie można precyzyjnie wskazać jedyne, izolowanego i samodzielnego czynnika charakteryzującego powierzchnię kontaktującą się z krwią pacjenta, który decyduje o całkowitym profilu biogodności danego urządzenia [110]. Podczas kontaktu krwi człowieka z obcą powierzchnią – w ustroju dochodzi do uruchomienia licznych, złożonych mechanizmów o różnym stopniu nasilenia w zależności od rodzaju bodźca, który je wywołał. Innymi słowy, aktualnie nie istnieje biomateriał czy też polimer, który w pełni spełniałby kryteria biogodności w odniesieniu do wszystkich parametrów biologicznych, które można uznać za jej markery w ustroju ludzkim. Nowoczesne polimery wykorzystywane obecnie do produkcji filtrów spełniają podstawowe kryteria biogodności i mogą być sterylizowane termicznie [18]. Błony polisulfonowe z uwagi na swoją bardzo wysoką biogodność oraz bardzo dobre parametry czynnościowe zostały nazwane „złotym standardem” wśród syntetycznych błon dializacyjnych. Polimer polisulfonu charakteryzuje się wieloma zaletami, niezbędnymi we współczesnej dializoterapii, których nie spełniają nie tylko błony naturalne ale także i inne syntetyczne polimery [18]. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy [wartości współczynnika zmienności (V%), parametru tempa zmian (T%) oraz jednopodstawowego wskaźnika dynamiki zmian (JWZ%)] w pełni potwierdzają tę opinię.

W niniejszej pracy nie udało się natomiast uwidocznić kanałów powierzchni wewnętrznej błony polisulfonowej (wg cytowanego piśmiennictwa - około 16 Å) ani też kanałów błony kuprofanowej. Przyczyna tego zjawiska leży nie tylko w zbyt małej rozdzielczości zastosowanej techniki obrazowania powierzchni (rozdzielczość pozioma około 10 nm, pionowa ok. 1 nm) lecz również dlatego, że obrazowania powierzchni błon dokonywano w warunkach statycznych, kiedy na błonę nie działało żadne ciśnienie hydrostatyczne.

W warunkach klinicznych, w trakcie hemodializy, na ścianę kapilary oddziałuje tzw. ciśnienie przezbłonowe (TMP), które stanowi podstawowy warunek dla zaistnienia procesu filtracji i konwekcji i które na drodze mechanicznego rozciągania (najprawdopodobniej) może zwiększać średnicę porów powierzchni wewnętrznych badanych błon. W celu dokładnego

wyznaczenia wielkości wejść do kanałów tworzących porowatą strukturę kapilary oraz oceny zmian zachodzących w ich obrębie po kolejnych krotnościach reutilizacji danego typu błony należałoby zastosować mikroskop skaningowy.

Przyszłościowym aspektem przeprowadzonych badań pozostaje biologiczna i fizyczna charakterystyka biofilmu białkowego powstającego podczas zabiegu hemodializy. Niezbędnym narzędziem wykorzystywanym w tym celu – mogą być ostrza mikroskopu AFM opłaszczone odpowiednimi przeciwciałami, skierowanymi przeciwko białkom, które prawdopodobnie pozostają na błonie dializacyjnej po sesji hemodializy.

5.2. WPLYW REUTYLIZACJI DIALIZATORÓW NA KLIRENS WYBRANYCH TOKSYN MOCZNICOWYCH

W mocznicy dochodzi do kumulacji w ustroju różnych związków nazywanych ogólnie toksynami mocznicowymi. W trakcie hemodializy usuwanie toksyn mocznicowych odbywa się jednocześnie na drodze trzech mechanizmów: dyfuzji, konwekcji i adsorpcji. Udział poszczególnych elementów uzależniony jest od rodzaju błony, jej współczynnika ultrafiltracji, współczynnika przepuszczalności oraz masy cząsteczkowej usuwanej substancji. Klirens dializatora jest podstawowym parametrem opisującym zdolność dializatora do oczyszczania krwi z danej substancji, który można zdefiniować jako objętość krwi całkowicie oczyszczoną z danej substancji w jednostce czasu. Wartości klirensu rzeczywistego a na jego podstawie wartości współczynnika przepuszczalności masowej dializatora (K_{oA}) można obliczyć praktycznie dla każdej substancji, dla której współczynnik przesiewalności błony dializacyjnej umożliwia jej eliminację.

Mocznik (m.c. 60 Da) jest już historycznym, „prototypowym” markerem rozpuszczalnych w wodzie toksyn niskocząsteczkowych. Jest to substancja bardzo dobrze usuwana wszystkimi, dostępnymi technikami dializy, której klirens uzależniony jest praktycznie tylko od wielkości przepływu krwi (Q_B), dializatu (Q_D) oraz współczynnika K_{oA} dializatora.

Powszechnie uznany i szeroko stosowany wskaźnik adekwatności dializy Kt/V , wykorzystujący wartości klirensu mocznika, jest ściśle związany z odległym rokowaniem i przeżywalnością chorych dializowanych, co udowodniono w licznych badaniach [14, 129, 166, 188]. Współcześnie zaakceptowany dolny próg tzw. adekwatnej dializy, oceniany przy pomocy wskaźnika Kt/V dla mocznika, wg modelu jednoprzedałowego - wynosi 1,2 [38, 122, 123]. Jednak wyniki opublikowanego w 2002 roku wielośrodkowego, randomizowanego badania *HEMO study* [43, 181] nie wykazały żadnej różnicy w rokowaniu pomiędzy chorymi, których wskaźnik adekwatności dializy Kt/V wynosił 1,3 czy też 1,7 - co uwarunkowane było przede wszystkim wartościami K_D i krótkim czasem dializ.

Chociaż wskaźnik Kt/V dla mocznika jest ściśle związany z przeżywalnością chorych dializowanych, to mocznik *per se* w stężeniach, jakie powszechnie stwierdzane są w toksemii mocznicowej, nie wykazuje istotnej toksyczności [182, 183, 185, 186].

O znikomej toksyczności mocznika może świadczyć badanie, w którym przez kilka miesięcy dodawano mocznik do płynu dializacyjnego w stężeniach znacznie przekraczających te, które stwierdzane są w mocznicy - a u obserwowanych pacjentów nie stwierdzono żadnych

negatywnych skutków [182]. Ten (pozorny) paradoks próbuje się tłumaczyć jednoczesnym zatrzymywaniem w ustroju metylamin, które mają działać neutralizująco wobec mocznika [94]. Niemniej jednak nie dysponujemy żadnymi badaniami potwierdzającymi tę hipotezę. Inną prawdopodobną przyczyną jest ścisły związek pomiędzy usuwaniem mocznika i potasu, który jest główną przyczyną zgonów chorych leczonych nerkozastępczo [12, 182].

Konkludując, w toksemii mocznicowej występują inne rozpuszczalne w wodzie związki niskocząsteczkowe, które wykazują dużą aktywność biologiczną. Niezwykle istotna - z punktu widzenia bezpieczeństwa chorego - jest świadomość, że związki te zachowują się zupełnie inaczej w trakcie zabiegu hemodializy aniżeli łatwo mierzalny i zasadniczo niegroźny - mocznik. Różnice w dynamice eliminacji tych związków należy przypisać zarówno innej ich dystrybucji w poszczególnych przedziałach (kompartmentach) ustroju a także charakteryzującej te związki i różniącej się od mocznika - kinetyce śródodializacyjnej, dotyczącej między innymi toksycznych guanidyn [183], nieorganicznych fosforanów czy też puryn [191]. Chociaż wskaźnik adekwatności Kt/V dla mocznika aktualnie wykorzystywany jest jako marker rokowania chorych dializowanych – to jednak nie wolno zapominać, że najbardziej toksyczne i nie oznaczane rutynowo w laboratoriach związki niskocząsteczkowe z uwagi na fakt wiązania się z białkami surowicy krwi - charakteryzują się zupełnie różną od mocznika kinetyką [183].

Zdecydowana większość toksyn mocznicowych związanych z białkami jest lipofilna [183]. Wiązanie z białkami, zwłaszcza gdy przekracza 90%, znacznie utrudnia eliminację tych substancji w trakcie sesji hemodializy, niezależnie od ich masy cząsteczkowej, nawet jeżeli są one porównywalne do masy cząsteczkowej mocznika czy kreatyniny [95].

Wiązanie z białkami działa jak bufor przeciwko toksycznym efektom biologicznym poszczególnych związków a hipoalbuminemia, poprzez zwiększenie ich wolnej frakcji, przyczynia się do wzrostu ich toksyczności [168]. Wysoce toksyczny p-krezol o masie cząsteczkowej zaledwie 108 Da nie jest skutecznie usuwany nawet przez błony wysokoprzepływowe, właśnie z uwagi na fakt wiązania się z albuminami [95]. Potwierdzeniem tego zjawiska jest udowodniona przez Vanholdera dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem wolnego p-krezolu a wskaźnikiem hospitalizacji wśród chorych hemodializowanych [182]. Mocznik nie może zatem stanowić substancji wzorcowej dla tej grupy toksyn mocznicowych [95, 190].

W związku z powyższym, należy mocno podkreślić fakt, że pomimo braku zmniejszenia się po kolejnych reutilizacjach (zarówno dializatorów kuprofanowych jak i polisulfonowych) wartości klirensu rzeczywistego mocznika i podobnie zachowującej się w trakcie sesji

hemodializy kreatyniny – co między innymi wykazano w niniejszej pracy - ich kinetyka śróddializacyjna nie może być w żadnym wypadku reprezentatywna dla usuwania wielu innych rozpuszczalnych w wodzie toksyn niskocząsteczkowych a także związków niskocząsteczkowych związanych z białkami, które przyczyniają się do rozwoju znacznie poważniejszych zaburzeń ogólnoustrojowych u dializowanych pacjentów aniżeli tak łatwo eliminowany i rutynowo oznaczany laboratoryjnie mocznik [183].

Do momentu, dokąd grupa tzw. toksyn średnicząsteczkowych (czyli substancji o masach cząsteczkowych pomiędzy 500 Da a 12 000 Da) pozostaje „nieuchwytna” dla oznaczeń laboratoryjnych - zasadniczym problemem dla naukowców i klinicystów pozostaje brak wyizolowanej i zidentyfikowanej substancji, która mogłaby stanowić dobry marker dla tej grupy związków [189].

Teza mówiąca o niekorzystnym wpływie toksyn średnicząsteczkowych na stan kliniczny i rokowanie pacjentów - obliżuje do intensywnego poszukiwania dróg ich skutecznej eliminacji. Jedynym współcześnie dostępnym rozwiązaniem mogącym zwiększyć stopień usuwania związków z tej grupy jest dializa z wykorzystaniem dializatorów wysokoprzepływowych (*high-flux*) lub hemodiafiltracja [198]. Skuteczność tych technik wykazano między innymi w przypadku leptyny [34, 196, 197], AGEs (ich stężenie malało zwłaszcza w przypadku stosowania błon polisulfonowych) [81] a także β 2M [107]. Pomimo tego - stężenia wyżej wymienionych związków (oraz wielu innych toksyn średnicząsteczkowych) - nadal utrzymywały się na wysokim poziomie. Chociaż dializa z wykorzystaniem błon *high-flux* obniża u chorych z cukrzycą stężenia AGEs o prawie 48% (i o 61% u chorych bez cukrzycy) – niemniej jednak stężenia tych związków wracają do punktu wyjścia już po 3 godzinach od zakończenia zabiegu [75]. Hamulcem, który pomimo stosowania idealnie biozgodnych błon o wysokim współczynniku przepuszczalności, zatrzymuje związki średnicząsteczkowe w ustroju jest zjawisko ich wielo - przedziałowej dystrybucji. Uwalnianie tych substancji z różnych kompartmentów biologicznych w kilka godzin po zakończeniu hemodializy jest znane w dializoterapii jako zjawisko odbicia (*rebound phenomenon*) - zwłaszcza w sytuacji intensyfikacji dializy na drodze skracania czasu zabiegu i zwiększania klirensu dializatora.

Rozważając problematykę klirensów rzeczywistych poszczególnych toksyn mocznicowych należy pamiętać o rozróżnieniu pomiędzy klirensem danej substancji a faktycznym jej usunięciem z ustroju podczas sesji hemodializy. Daną cząsteczkę możemy usunąć tylko z tej objętości dystrybucji, która w trakcie sesji hemodializy będzie miała

kontakt z dializatorem. Nie możemy natomiast wpłynąć na klirens tkankowy i komórkowy danej substancji, który znacznie ogranicza usuwanie jej z tkanek chorego [27].

Podczas hemodializy klirens dializatora i czas trwania zabiegu są ściśle ze sobą powiązane, stanowiąc dwa fundamentalne czynniki warunkujące skuteczność całego zabiegu. Pomimo utrzymywania się wartości klirensów zarówno związków nisko- jak i średniocząsteczkowych na stałym poziomie, rzeczywiste usuwanie tych substancji z ustroju pacjenta stopniowo maleje wraz ze spadkiem ich gradientów stężeń. Małe cząsteczki szybko tracą swój gradient stężeń, natomiast związki o większych masach cząsteczkowych utrzymują go znacznie dłużej. Zatem pod koniec sesji hemodializy w zasadzie ma miejsce tylko usuwanie substancji średniocząsteczkowych [69]. W związku z powyższym, to czas zabiegu (podobnie jak wartość współczynnika przepuszczalności błony dializacyjnej) można traktować jako swoisty marker usuwania toksyn średniocząsteczkowych. Współczesne strategie hemodializy zdają się pomijać ten fakt. Przyjmując czas za parametr operacyjny dializy, pomimo przekonujących dowodów o pozytywnym wpływie wydatkowanego czasu dializy (zarówno t - jako czasu pojedynczej sesji HD, jak czasu T - całkowitego czasu tygodniowego HD) na rokowanie chorych - jesteśmy świadkami wręcz odwrotnego zjawiska - nagminnego dążenia nefrologów (zwłaszcza amerykańskich) do skracania czasu dializy za cenę zwiększenia klirensu dializatorów. Zakładając, że z wielu powodów te działania będą dominowały - tym większą uwagę należy poświęcać zagadnieniom utrzymania na zakładanym poziomie skutecznego K_D . Jest to istotne również z innego punktu widzenia - od dziesięcioleci uznaje się stężenia mocznika i kreatyniny za markery skuteczności dializy lub zaawansowania toksemii mocznicowej - jakby zapominając, że te dwa związki w rzeczywistości są tylko przysłowiowymi wierzchołkami góry lodowej.

Jedną z dróg rozwiązania problemu zjawiska odbicia jest wdrożenie nowego schematu hemodializoterapii polegającego albo na krótkich i codziennych albo na długich i przerywanych sesjach hemodializ. Taki system terapii „dałby czas” toksynom na przeniknięcie z przedziałów, które nie są w bezpośrednim kontakcie z dializatorem do wody osocza krwi, skąd mogłyby potem zostać usunięte [183].

Potwierdzeniem tej hipotezy są wyniki badań Fagugli i wsp. którzy wykazali, że bardziej fizjologiczny schemat codziennej, krótkiej dializy znacznie zmniejsza przeddializacyjne stężenia licznych, bardzo trudno usuwalnych podczas standardowej dializy toksyn mocznicowych związanych z białkami, w tym AGEs, siarczanu indoksyłu, kwasu 3 - indoliloctowego oraz p-krezolu [45, 46].

W niniejszej pracy jako substancję wzorcową związków średnicząsteczkowych początkowo wybrano witaminę B₁₂ (m.cz. 1350 Da), gdyż jest ona często wykorzystywanym do badań wartości klirensów dializatorów w warunkach *in vitro* markerem tej grupy toksyn mocznicowych. Niemniej jednak, z powodu jej bardzo silnego wiązania się z białkami surowicy – nie jest przydatna do oznaczania wartości klirensów dializatorów w warunkach klinicznych.

W trakcie przepływu krwi przez dializator pod wpływem ciśnienia przezbłonowego dochodzi do zjawiska ultrafiltracji, czyli usuwania wody z przedziału krwi dializatora. Zjawisko to przyczynia się do zwiększenia wartości hematokrytu oraz zwiększenia stężenia białek osoczowych w surowicy i w efekcie - do zagęszczenia krwi [151].

Współczynnik przesiewalności (Sc) błon *low-flux* dla witaminy B₁₂ oznaczany *in vitro* jest bardzo wysoki, wynosi bowiem około 70% [18]. Należałoby się zatem spodziewać znaczącej wartości klirensu rzeczywistego tej substancji. W niniejszej pracy próba oznaczenia witaminy B₁₂ w dializacie jednak się nie powiodła, gdyż jej stężenia znajdowały się poniżej dolnej granicy czułości metody laboratoryjnej (34 pg/ml) - co w istocie przeczy wysokiej wartości Sc podawanej przez producenta dializatora.

Dzięki pomiarom laboratoryjnym można uzyskać informację dotyczącą stężenia danej substancji w próbce surowicy krwi dializowanego człowieka. Stężenia witaminy B₁₂ we krwi oznaczanej za dializatorem były w prawie wszystkich przypadkach większe (lub równe) aniżeli przed filtrem, ponieważ w momencie przepływu krwi przez dializator uległa ona zagęszczeniu na skutek zjawiska ultrafiltracji. Jak wspomniano - średnica kanału błon *low-flux* wynosi około 1,6 nm. Analizując wyniki pracy Clarka i Gao można dojść do wniosku, że przesiewalność takiej błony dla cząsteczki o masie witaminy B₁₂ wynosi zaledwie ok. 5%, co w praktyce oznacza bardzo niską eliminację tego markera w warunkach klinicznych [28].

W ludzkim osoczu cyjanokobalamina jest praktycznie w całości związana z trzema białkami nośnikowymi (z transkobalaminą I, II i III o m. cz. ok. 60 - 70 kDa), co praktycznie uniemożliwia jej przenikanie przez błonę *low-flux*. Tłumaczy to brak możliwości obliczenia ze strony przedziału krwi (i dializatu) wartości klirensu dla tej - wydawałoby się idealnej cząsteczki - markera.

Leypoldt i wsp. wykazali, że przy stosowaniu dializatorów o większym klirensie dla witaminy B₁₂ ryzyko względne śmiertelności jest mniejsze - nawet przy takim samym wskaźniku Kt/V dla mocznika [99].

Pomimo, iż koncepcja mocznicy jako toksemii średnich cząsteczek jest cały czas aktualna - nadal nie można scharakteryzować ilościowo usuwania toksyn o masach spełniających

kryteria związków średniocząsteczkowych [29, 87]. Wspomniany uprzednio przewlekły „stan niedodializowania” pod postacią kumulacji w ustroju ludzkim tzw. średnich cząsteczek oraz substancji wiążących się z białkami skutkuje negatywnie na stan układu sercowo – naczyniowego, stanowiąc główną przyczynę chorobowości i śmiertelności w populacji chorych dializowanych [188]. Należy zatem dążyć, aby były one skutecznie eliminowane między innymi poprzez upowszechnianie dostępności dializatorów o wyższym współczynniku przepuszczalności i wysokich wartościach KoA dla wszystkich pacjentów, którzy wymagają takiej metody leczenia nerkozastępczego.

Wiele doniesień wskazuje, że stosowanie błon *high-flux*, a zatem większy stopień usuwania związków średniocząsteczkowych, wywiera niezwykle korzystny wpływ na stan kliniczny pacjentów. Wyniki badania przeprowadzonego przez Leypoldta i wsp. wykazały, że zarówno eliminacja małych jak i średnich cząsteczek, niezależnie od siebie, wpływa na odległe rokowanie chorych przewlekle hemodializowanych. Stosowanie dializatorów, które skuteczniej eliminują średnie cząsteczki jest związane ze zmniejszonym ryzykiem śmiertelności w tej grupie chorych (niezależnie od uzyskanego wskaźnika Kt/V dla mocznika) [99]. Wyniki uzyskane przez Leypoldta i wsp. potwierdzają także późniejsze doniesienia Lesaffera i wsp. dotyczące najbardziej nowoczesnych błon dializacyjnych *high-flux*, które charakteryzowały się bardzo dobrymi parametrami eliminacji średnich cząsteczek. Również i ci autorzy wykazali poprawę rokowania hemodializowanych chorych przy nie zwiększonym istotnie klirensie dla samego mocznika [95].

Ponadto, oprócz znacznie skuteczniejszej eliminacji związków średniocząsteczkowych – dializatory *high-flux* charakteryzują się większą zdolnością do adsorpcji powierzchniowej w porównaniu do ich odpowiedników niskoprzepływowych, co stanowi bardzo pożądane zjawisko w procesie eliminacji toksyn związanych z białkami [182].

Wynik lepszej przeżywalności chorych hemodializowanych przy użyciu błon wysokoprzepływowych w porównaniu do chorych dializowanych przy wykorzystaniu błon *low-flux* potwierdzono również w badaniu prowadzonym w ostatnich latach przez French Study Group for Nutrition in Dialysis, w którym ryzyko względne śmiertelności było o 38% mniejsze w grupie chorych dializowanych przy użyciu błon *high-flux* [24].

Do najistotniejszych, potwierdzonych korzyści wynikających ze stosowania błon wysokoprzepływowych zalicza się nie tylko zmniejszenie częstości występowania amyloidozy dializacyjnej [106] ale również ograniczenie śmiertelności z przyczyn sercowo – naczyniowych, zmniejszenie podatności na zakażenia [13], mniejsze nasilenie niedokrwistości [76] i hiperlipidemii [11], poprawę stanu odżywienia [59] i funkcji

obwodowego układu nerwowego [176] oraz dłuższe utrzymanie resztkowej funkcji nerek [65]. Bardziej powszechne zastosowanie dializatorów wysokoprzepływowych mogłoby zatem niezwykle korzystnie wpłynąć na zmniejszenie częstości występowania i nasilenia wszystkich najpoważniejszych przewlekłych powikłań hemodializoterapii, poprawiając odległe rokowanie w tej grupie chorych, ale oznacza to także, że mocznik nie może być dłużej markerem adekwatności, ponieważ klirensy tego związku są niereprezentatywne.

W ostatnich latach obserwuje się gwałtowny przyrost liczby pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek wymagających leczenia nerkozastępczego. Analizując koszty hemodializy, najdroższym jej elementem w wielu krajach staje się sam dializator. Jedynym rozsądnym rozwiązaniem mającym na celu zmniejszenie nakładów finansowych na hemodializoterapię jest wielokrotne użycie tego samego dializatora [42].

Bardzo istotnym elementem procesu wielokrotnego użycia tego samego dializatora jest wybór odpowiedniej substancji chemicznej służącej do jego reutilizacji. Substancja taka powinna zapewnić nie tylko bardzo dobre wypłukiwanie resztek krwi z kapilar ale również usuwanie białek osadzonych na powierzchni błony dializacyjnej a ponadto powinna być możliwie bezpieczna dla chorego i personelu.

Główną zaletą kwasu nadoctowego (Renalin®) jest fakt, iż nie narusza on struktury fizycznej i chemicznej błony dializacyjnej, natomiast wadą, że nie usuwa w całości biofilmu białkowego i komórkowego, osadzającego się na powierzchni błony po każdej sesji hemodializy. Zjawisko adsorpcji białek na powierzchni błon dializacyjnych ma charakter kowalencyjny lub niekowalencyjny i dotyczy w pierwszej fazie przede wszystkim albuminy, fibrynogenu, immunoglobuliny G oraz składowej C4 dopełniacza a następnie kininogenu i czynnika Hagemana [125]. Nie usunięty w całości biofilm białkowy w kolejnych krotnościach reutilizacji stopniowo narasta, zmniejsza efektywną powierzchnię dializatora oraz wymiary kanałów błonowych, zaburzając tym samym parametry dyfuzyjno – konwekcyjne błony półprzepuszczalnej [98, 101, 195]. Stanowi to dodatkową barierę dla usuwanych cząstek i przez to zmniejsza stopień ich eliminacji [25, 30].

Inny związek stosowany do reutilizacji - podchloryn sodu - w całości degradowuje pozostałości białkowe i komórkowe oraz przywraca wyjściową średnicę kanałów błonowych. Udowodniono, że reutilizacja syntetycznych błon *high-flux* przy użyciu podchlorynu sodu zwiększa klirens toksyn średnio- i wielkocząsteczkowych wraz z liczbą wykonywanych reutilizacji. Mechanizmem tłumaczącym to zjawisko jest fakt, iż podchloryn sodu nie tylko praktycznie w całości usuwa biofilm białkowy i komórkowy z powierzchni błony ale również wypłukuje z błony poliwinylpirolidon (PVP), związek nadający syntetycznej błonie

hydrofilność oraz zmniejszający średnicę porów. Utrata PVP zmniejsza hydrofilność błony i tym samym zwiększa średnicę jej kanałów. Z uwagi na swoje własności chemiczne, podchloryn sodu nie powinien być stosowany do reutilizacji błon celulozowych, gdyż te ulegają pod jego wpływem zniszczeniu (chemiczna reakcja pomiędzy ługiem a celulozą) [61]. 10 - Krotna reutilizacja błon o wysokim współczynniku przepuszczalności przy użyciu podchlorynu sodu zwiększa klirens β 2M o około 40 - 50% w porównaniu do pierwszego użycia [30]. Jednak Kaplan i wsp. [84] oraz Leyboldt i wsp. [97] wykazali, że po przekroczeniu pewnej określonej liczby reutilizacji (około 10) błon *high-flux* podchlorynem sodu dochodzi do niepożądanego utraty do dializatu albumin (m.c. ok. 66000 Da) w ilości nawet do 20 g w trakcie jednorazowej sesji hemodializy.

Wieloletnia dyskusja odnosząca się do wielokrotnego użycia dializatorów dotyczy między innymi problematyki wpływu procesu reutilizacji na stopień biozgodności dializatorów, zachowanie się klirensu toksyn niskocząsteczkowych i średnicząsteczkowych oraz rokowanie chorych opisane współczynnikami chorobowości i śmiertelności. Często poruszane są także aspekty dotyczące ryzyka zakażeń wirusowych (zarówno chorych jak i personelu medycznego), rozwoju reakcji pyrogennych, toksyczności związanej z ciągłą ekspozycją chorego na środki chemiczne wykorzystywane w procesie reutilizacji a także kwestie bezpośredniego bezpieczeństwa personelu medycznego odpowiedzialnego za przeprowadzanie reutilizacji dializatorów [79, 140, 194].

Argumentem przemawiającym za reutilizacją dializatorów jest zmniejszenie częstości reakcji pierwszego użycia na skutek uwalnianego tlenku etylenu (ETO), stosowanego do fabrycznej sterylizacji dializatorów. Jednak płukanie i rozprężanie dializatora przez kilkanaście minut przed dializą praktycznie eliminuje ten problem [91, 96, 116, 134]. Ponadto - poza fabryczną dezynfekcją dializatorów przy pomocy ETO – coraz bardziej popularne stają się metody sterylizacji przy użyciu promieniowania jonizującego gamma i pary wodnej o wysokiej temperaturze. Sami producenci te dwie metody określają mianem „biozgodnych” – co pozbawia zwolenników reutilizacji kolejnego argumentu.

Z medycznego punktu widzenia zwolennicy reutilizacji dializatorów wskazują na zwiększoną biozgodność dializatorów ocenianą stopniem aktywacji układu dopełniacza drogą alternatywną. Jak jednak udowodniono - różnica w aktywacji układu dopełniacza przez dializator nowy i poddany reutilizacji przy użyciu kwasu nadoctowego - jest klinicznie praktycznie nieistotna, niezależnie od rodzaju tworzywa, z którego wykonana jest błona (celulozowa lub syntetyczna) [28]. Argument poprawy biozgodności (jako usprawiedliwienie reutilizacji dializatorów) może okazać się mało przekonujący, co również wykazano w

niniejszej pracy. Ponadto motyw poprawy stopnia biogodności nie powinien mieć również żadnego uzasadnienia w przypadku dializatorów polisulfonowych, które z definicji są błonami wysoce biogodnymi.

Do niewątpliwych zalet procesu reutilizacji zaliczyć należy zmniejszenie kosztów leczenia dializacyjnego oraz ograniczenie produkcji zagrażających środowisku niebezpiecznych odpadów szpitalnych [91, 96, 116, 134].

Przeciwnicy wielokrotnego używania dializatorów przypominają, że kwas nadoctowy jest środkiem silnie utleniającym, który w trakcie procesu reutilizacji tylko częściowo usuwa białka osadzone na powierzchni błony. Pozostałe proteiny ulegają denaturacji i utlenieniu, co prowadzi do powstania ujemnych ładunków na powierzchni uprzednio obojętnej elektrostatycznie błony. To zjawisko wykorzystano w wyjaśnieniu genezy reakcji anafilaktycznych, których występowanie bardzo dobrze korelowało z reutilizacją dializatorów kwasem nadoctowym oraz przyjmowaniem przez chorych inhibitorów konwertazy angiotensyny. Elektrostatycznie ujemnie naładowana powierzchnia błony dializacyjnej aktywowała czynnik Hagemana, kallikreinę i kininy, co w połączeniu z hamującym wpływem inhibitorów konwertazy angiotensyny na rozpad bradykininy wyzwało reakcję anafilaktyczną. Po zaprzestaniu reutilizacji nie obserwowano kolejnych epizodów anafilaksji, pomimo dalszego przyjmowania wymienionych leków przez chorych [193].

Reutilizacji nie zalecają (z oczywistych powodów) producenci dializatorów informując, że są to produkty jednorazowego użycia. Pozamedyczne względy ekonomiczne na całym świecie usprawiedliwiają reutilizację, pozwalającą na znaczące zredukowanie kosztów dializoterapii. Jednakże w każdym kraju problem ten ma nieco inne zabarwienie. W Japonii stosowanie dializatorów sterylizowanych ETO oraz reutilizacja jakichkolwiek dializatorów są prawnie zabronione. W krajach takich jak USA – ekonomia reutilizacji jest etycznie usprawiedliwiona tylko dla drogich dializatorów *high-flux*, chociaż i tam już zwraca się uwagę na potencjalnie niekorzystne konsekwencje uzdatniania filtrów, które manifestują się zmniejszeniem klirensu toksyn średniocząsteczkowych.

Argumenty przemawiające zarówno na korzyść jak i na niekorzyść procesu reutilizacji w wielu przypadkach są słuszne i nie można ich pominąć milczeniem. Aktualnie nie jest możliwe jednoznaczne rozstrzygnięcie tego problemu. Natomiast prawdą jest, że reutilizacja dializatorów stanowi swoisty kompromis pomiędzy zapewnieniem chorym bezpiecznej i adekwatnej dializy a względami czysto ekonomicznymi i w pewnej mierze - ochroną środowiska naturalnego. Głównym celem niniejszych rozważań jest poszukiwanie takich

rozwiązań, które w konkretnych realiach ekonomicznych będą mogły zagwarantować jak największą korzyść dla chorego człowieka.

Wyniki badań niniejszej pracy mogą stanowić przyczynek do rozważań, czy za doraźny zysk ekonomiczny nie przyjdzie nam w nieodległej już przyszłości zapłacić innych, znacznie wyższych kosztów będących następstwem gorszej eliminacji związków średniocząsteczkowych?

W obecnej pracy środkiem chemicznym wykorzystanym w procesie reutilizacji dializatorów był kwas nadoctowy (Renalina®), zatem w dyskusji zasadniczą uwagę skupiono na doniesieniach związanych z tą substancją.

Głównym argumentem przemawiającym przeciwko reutilizacji jest realne ryzyko zmniejszenia czynnej powierzchni błony dializacyjnej na skutek odkładania się białek w kanałach błonowych w trakcie kolejnych użyc diaizatora. Prowadzi to do spadku parametrów dyfuzyjno – konwekcyjnych błony półprzepuszczalnej i w konsekwencji do redukcji eliminacji toksyn mocznicowych i dostarczenia pacjentowi niedostatecznej dawki dializy. Zgodnie z wynikami badań Gotch'a, zmniejszenie wartości klirensów małych cząsteczek jest możliwe do przewidzenia, gdyż stanowi funkcję FBV dializatora [104]. Spadek wartości klirensu mocznika wynosi zaledwie 5 – 11%, pod warunkiem utrzymania wartości PPV dializatora powyżej 80% wartości wyjściowej (wytyczne AAMI zabraniają ponownego użycia dializatora, którego objętość po płukaniu jest mniejsza niż 80% wartości fabrycznej) [52, 84, 119].

W światowym piśmiennictwie można znaleźć prace wielu autorów, którzy podjęli wysiłek jakościowej i ilościowej charakterystyki zachowania się wartości klirensów toksyn mocznicowych o małej i średniej masie cząsteczkowej w aspekcie wielokrotnego użycia dializatorów. Do tego grona należą między innymi Garred i wsp., którzy badali zachowanie wartości klirensów mocznika i kreatyniny dializatorów polisulfonowych reutilizowanych średnio 14 razy przy pomocy kwasu nadoctowego. Wartości klirensów oraz współczynniki przepuszczalności masowej dla tych substancji przez cały czas trwania badania utrzymywały się na stałym poziomie [53].

Podobne badanie przeprowadzili Leypoldt i wsp., którzy podjęli się oceny zachowania wartości klirensów związków niskocząsteczkowych (mocznika, kreatyniny, nieorganicznych fosforanów) podczas 15 - krotnej reutilizacji kwasem nadoctowym dializatorów *low-flux* wykonanych z kuprofanu i octanu celulozy. Po przeprowadzeniu kolejnych reutilizacji autorzy również nie odnotowali istotnego spadku klirensów małych cząstek w żadnym z badanych dializatorów [101]. Również Kaye i wsp., badając wartości klirensów substancji

niskocząsteczkowych dializatorów *low-flux* wykazali, że nie dochodzi do istotnego ich spadku pod warunkiem zachowania odpowiedniej wartości PPV dializatora. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy sformułowali wniosek, że prawidłowo przeprowadzony proces reutilizacji nie wpływa na stopień eliminacji toksyn niskocząsteczkowych [86].

Inne rezultaty uzyskano w dużym, wieloośrodkowym, prospektywnym badaniu – HEMO *study*, w którym oceniano zachowanie klirensów mocznika i β 2M w zależności od liczby reutilizacji dializatora, tworzywa, z którego wykonano błonę oraz współczynnika przepuszczalności dializatora [25]. Wyniki badania HEMO wykazały, że klirens mocznika w trakcie procesu reutilizacji kwasem nadctowym ulega jednak znamiennej statystycznie zmniejszeniu, lecz tylko o 1,1 – 1,9 %. Omawiane badanie z uwagi na dużą liczbę pacjentów (około 1200), 45 zaangażowanych ośrodków dializ oraz randomizację - pozwoliło na wykrycie nawet względnie małych zmian. Badanie wykazało także, że w trakcie reutilizacji kwasem nadctowym dochodziło do spadku klirensu mocznika nawet wówczas, kiedy wytyczne AAMI były rygorystycznie przestrzegane. Zwrócił także uwagę istotny statystycznie mniejszy spadek klirensu mocznika w przypadku błon *low-flux* (1,1%) aniżeli *high-flux* (1,9%).

Na te pozornie optymistyczne informacje trzeba spojrzeć jednak z innej perspektywy w kontekście ich zestawienia z danymi dotyczącymi wskaźnika Kt/V dla mocznika, którego spadek o 0,1 związany jest ze wzrostem śmiertelności chorych o 5 - 7% [67, 96, 97, 99, 116, 134].

Wyniki uzyskane w obecnej pracy są zgodne z rezultatami cytowanych powyżej doniesień z piśmiennictwa. Po przeprowadzeniu 5 reutilizacji kwasem nadctowym błon kuprofanowych oraz 10 – reutilizacji tym samym środkiem reutilizującym – błon polisulfonowych, w żadnym przypadku użycia dializatora, w żadnej z badanych grup chorych - nie uzyskano znamiennej statystycznie spadku klirensu rzeczywistego ani mocznika ani kreatyniny.

Niemniej jednak, w przypadku kwasu moczowego odnotowano znamiennej statystycznie spadek klirensu w końcowych krotnościach reutilizacji (w 6. użyciu błony kuprofanowej i 11. użyciu błony polisulfonowej), pomimo ścisłego stosowania się do standardów reutilizacji i utrzymywania PPV w wyznaczonych granicach. Natomiast brak stwierdzenia istotnego statystycznie spadku klirensu rzeczywistego mocznika oraz drugiego markera niskocząsteczkowego – kreatyniny może tłumaczyć mała liczba badanych pacjentów, co uniemożliwiło wychwycenie drobnych różnic w wartościach klirensów - a także stosunkowo niewielka liczba wykonanych reutilizacji (5 i 10). W USA średnia liczba reutilizacji wynosi

15, średnia maksymalna - 36, lecz w indywidualnych przypadkach osiągane są zastraszające „rekordy” w liczbie ponad 190 reutilizacji jednego filtra [84, 116].

Podsumowując powyższe rozważania oraz uzyskane własne wyniki można sformułować wniosek, że klirens małych cząsteczek w trakcie kolejnych reutilizacji zmniejsza się tylko w nieznacznym stopniu, niezależnie od rodzaju użytego środka reutilizującego oraz tworzywa z jakiego jest wykonana błona dializacyjna, co tak naprawdę nic nie oznacza - w kontekście dalszych rozważań o spadku klirensu dla markerów średniocząsteczkowych.

W światowym piśmiennictwie coraz częściej można spotkać się ze stanowiskiem, że rokowanie chorych dializowanych w zasadniczym stopniu uzależnione jest od stopnia eliminacji tzw. średnich cząstek [25]. Pomija się jednak milczeniem fakt, że praktykowana na szeroką skalę reutilizacja dializatorów wywiera znamieny wpływ na zachowanie klirensów związków średniocząsteczkowych.

Zachowanie się klirensów substancji średniocząsteczkowych w przypadku dializatorów poddawanych procesowi reutilizacji najłatwiej jest prześledzić monitorując wartości klirensów łatwo oznaczalnego laboratoryjnie markera tej grupy związków czyli β_2 – mikroglobuliny (β_2M) [174].

We wspomnianym już wcześniej badaniu HEMO *study* średni klirens β_2M dializatorów *low-flux* podczas pierwszorazowego użycia wynosił poniżej 10 ml/min [25]. Brak istotnego wzrostu wartości klirensu badanej substancji pomimo przeprowadzonej reutilizacji dializatora polisulfonowego *low-flux* podchlorynem sodu spowodowany może być zbyt małymi wymiarami kanałów błonowych, które nawet po uszkodzeniu struktury błony - nie zwiększyły się na tyle, aby umożliwić eliminację tego białka. Ta niezwykle mała skuteczność eliminacji tej cząsteczki sugeruje, że mechanizm usuwania β_2M oparty jest głównie na konwekcyjnym transporcie przezbłonowym - a w mniejszym stopniu na adsorpcji powierzchniowej.

Średni klirens β_2M dializatorów *high-flux* w omawianym HEMO *study* wynosił średnio 35 ml/min. 10 – Krotna reutilizacja dializatorów zarówno celulozowych jak i polisulfonowych przy użyciu kwasu nadoctowego doprowadziła do spadku wartości klirensu tego markera (w przypadku błony celulozowej - o około 50%, błony polisulfonowej – o około 11%). Natomiast 10 – krotna reutilizacja dializatorów *high-flux* (F80B) przy użyciu podchlorynu sodu w połączeniu z formaliną doprowadziła do wzrostu klirensu β_2M o 86%, natomiast połączenie podchlorynu sodu z kwasem nadoctowym spowodowało wzrost eliminacji tylko o 64% [25]. Zwiększenie wartości klirensu β_2M jest rezultatem wzrostu porowatości

powierzchni błony - a co za tym idzie - zwiększenia wartości współczynnika przesiewalności dla tej cząsteczki wskutek działania podchlorynu sodu na polimer polisulfonowy [84].

Podobny wynik potwierdzający niekorzystny wpływ kwasu nadoctowego na klirens związków o większej masie cząsteczkowej uzyskali także Ouseph i wsp. którzy wykazali, że reutilizacja polisulfonowych błon *high-flux* przy użyciu Renaliny® pomimo utrzymania klirensu mocznika po kolejnych reutilizacjach na względnie stałym poziomie, powoduje jednakże znamiennej statystycznie spadek eliminacji β 2M z 30% (podczas pierwszego użycia dializatora) do 12% (podczas 10. użycia) pomimo utrzymania PPV powyżej 80% wartości wyjściowej [128].

Klirens β 2M w przypadku błon niskoprzepływowych (który z praktycznego punktu widzenia jest zupełnie nieistotny - wynosi bowiem poniżej 5 ml/min) - nie ulega zmianie po kolejnych reutilizacjach dializatora kwasem nadoctowym [100]. Jest zatem niecelowe stosowanie go do oceny klirensów błon o niskim współczynniku przepuszczalności. Warto natomiast sięgnąć po inny marker o dyfuzyjnej drodze klirensu, którym jest np.: kwas foliowy o masie cząsteczkowej 441 Da.

Analizując uzyskane w niniejszej pracy wartości klirensów tego markera po kolejnych reutilizacjach kwasem nadoctowym niskoprzepływowych błon kuprofanowych stwierdzono istotny statystycznie spadek jego eliminacji o około 33% i o 45% odpowiednio po 4. i po 5. reutilizacji dializatora. W przypadku niskoprzepływowych błon polisulfonowych istotny statystycznie spadek eliminacji kwasu foliowego odnotowano już po 3. reutilizacji. Wartości klirensu kwasu foliowego pomiędzy 3. a 7. reutilizacją były mniejsze w porównaniu do nowego filtra o 36 – 39%, jakkolwiek utrzymywały się na względnie stałym poziomie. Natomiast po przekroczeniu liczby 10 reutilizacji dializatora - klirens kwasu foliowego uległ zmniejszeniu aż o 54% w porównaniu do nowego filtra. Zatem po szóstym (w przypadku błon kuprofanowych) i po jedenastym (w przypadku błon polisulfonowych) użyciu dializatora *low-flux* cząsteczki o m.cz. rzędu zaledwie 441 Da usuwane są tylko w połowie w porównaniu do nowych filtrów.

Uzyskane w niniejszej pracy wartości klirensów substancji wzorcowej toksyn średnicząsteczkowych dla dializatorów o niskim współczynniku przepuszczalności świadczą, że liczba reutilizacji dializatorów kuprofanowych nie powinna przekraczać trzech, natomiast dializatorów polisulfonowych – siedmiu, jeżeli zamiarem dializujących jest nadal skuteczna dializa.

Informacje zaczerpnięte z cytowanych uprzednio doniesień oraz dane uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają teorię, że reutilizacja dializatorów przy wykorzystaniu kwasu

nadoctowego, wobec braku możliwości skutecznego usunięcia pozostałości filmu białkowego z wnętrza kanałów błonowych prowadzi w konsekwencji do zmniejszenia ich średnicy i redukcji eliminacji związków głównie o większej masie cząsteczkowej (co w niniejszej pracy - dla dializatorów niskoprzepływowych - wykazano już dla cząstek o masie 441 Da).

Należy zatem mieć świadomość, że utrzymanie odpowiednio wysokich wartości klirensów mocznika w przebiegu kolejnych reutilizacji pozostaje w sprzeczności z utrzymaniem wysokich wartości klirensów pozostałych substancji - zwłaszcza tych, o większej masie cząsteczkowej [174]. Zjawisko to można postrzegać jako jedną z fundamentalnych przyczyn niedodializowania, co w rezultacie przyczynia się do znacznego pogorszenia rokowania chorych przewlekle leczonych nerkozastępczo przy użyciu wielokrotnie reutilizowanych dializatorów.

W piśmiennictwie istnieje bardzo duża liczba doniesień dotyczących rokowania chorych dializowanych przy użyciu dializatorów poddawanych procesowi reutilizacji. Wyniki tych badań bardzo się od siebie różnią, a często nawet wzajemnie wykluczają. Związane jest to głównie z różnym sposobem projektowania oraz prowadzenia takich badań [31, 49, 68, 202]. Wielu autorów, w tym między innymi Held i wsp. [68], Port i wsp. [140], Feldman i wsp. [47, 48, 49] oraz Collins i wsp. [31] - dokonało próby skorelowania śmiertelności chorych hemodializowanych z następującymi czynnikami: miejscem prowadzenia terapii nerkozastępczej (ośrodki typu *for profit* vs przyszpitalne stacje dializ - na korzyść chorych dializowanych w szpitalach) [31, 88, 140]; techniką reutilizacji (ręczna vs automatyczna - na korzyść automatycznej) [68, 202]; tworzywem z jakiego wykonano błony dializacyjne (celulozowe i pochodne vs syntetyczne - na korzyść syntetycznych); wartością współczynnika przepuszczalności błony dializacyjnej (*low-flux* vs *high-flux* - na korzyść *high-flux*) oraz oczywiście - z rodzajem użytego środka reutilizującego (kwas nadoctowy, formalina vs podchloryn sodu i inne warianty, gdzie wyniki lepszej przeżywalności uzyskano w przypadku reutilizacji podchlorynem sodu) [49, 68].

Held i wsp. przeprowadzili duże, prospektywne badanie, którym objęto grupę prawie 53500 pacjentów z 673 ośrodków reutilizujących dializatory *low-flux* przy użyciu kwasu nadoctowego oraz 12500 pacjentów ze 184 ośrodków, w których w ogóle nie reutilizowano dializatorów. Rezultaty tego badania wykazały, że śmiertelność chorych z ośrodków reutilizujących dializatory była o 13% większa w porównaniu do śmiertelności chorych z ośrodków, w których dializatory używane były tylko jeden raz. Badanie to wykazało również, że śmiertelność chorych dializowanych przy wykorzystaniu reutilizowanych błon *high-flux*

była mniejsza w porównaniu do śmiertelności chorych dializowanych przy wykorzystaniu niereużytylizowanych błon *low-flux* [68].

W przytoczonych powyżej badaniach można odczytać wyraźną tendencję mówiącą o gorszym rokowaniu chorych dializowanych przy użyciu reużytylizowanych kwasem nadctowym dializatorów niskoprzepływowych, w porównaniu do chorych dializowanych przy wykorzystaniu niereużytylizowanych błon o wysokich współczynnikach przepuszczalności. Przyczyna tego zjawiska leży zarówno po stronie samych błon *low-flux*, które z powodu swojej nanostruktury nie są w stanie zapewnić choremu prawidłowej eliminacji związków średnicząsteczkowych ani też związków niskocząsteczkowych związanych z białkami. Wielokrotne reużytylizowanie dializatorów niskoprzepływowych kwasem nadctowym, który nie jest w stanie usunąć wszystkich pozostałości białkowych z powierzchni błony i jeszcze bardziej ogranicza jej możliwości filtracyjne - skutkuje niedodializowaniem i nierozpoznaną klinicznie ani laboratoryjnie toksenią mocznicową, która jest następstwem procesu reużytylizacji. Jeżeli do wyżej wymienionych, niekorzystnych czynników dołączy się niska biogodność takiej mało skutecznej filtracyjnej błony, która przyczynia się do stałego pobudzania układu immunologicznego chorego - to natychmiast uzyskujemy statystyczne odzwierciedlenie tej sytuacji we wzrastających wskaźnikach chorobowości i gorszego odległego rokowania tych pacjentów.

Omawiając złożoną problematykę reużytylizacji nie wolno zapominać o integralnym jej ogniwie - czyli o pacjencie. Choremu należy uczciwie i rzetelnie wytłumaczyć na czym polega proces reużytylizacji, jakie są jego cele, korzyści i wady. Jest kwestią oczywistą, że współczesna dializoterapia stoi na ekonomiczno – etycznym rozdrożu, balansując pomiędzy wysokimi kosztami leczenia nerkozastępczego a ekonomicznymi naciskami ukierunkowanymi na ograniczenie kosztów poprzez masowe i wielokrotne użycie dializatorów. Z przyczyn ekonomicznych - nie jest możliwe (nawet w najbogatszych krajach świata) zapewnienie wszystkim chorym jednorazowych dializatorów *high-flux*. Natomiast należy konsekwentnie dążyć do stopniowej zmiany długofalowej strategii w zakresie dializoterapii.

Dializatory o wysokim współczynniku przepuszczalności, wykonane z wysoce biogodnych materiałów, powinny stopniowo zastępować bioniezgodne filtry niskoprzepływowe. Ponadto dializatory *low-flux*, na których nadal wykonuje się znakomitą większość zabiegów hemodializy powinny być wykonane z jak najbardziej biogodnych tworzyw - a w najbliższej przyszłości - stać się bezwzględnie sprzętem medycznym wyłącznie jednorazowego użytku. Reużytylizacja powinna być etycznie uzasadniona jedynie w przypadkach, w których dzięki niej

można sięgnąć po droższe, bardziej biozgodne - a zatem bezpieczniejsze dla chorego, dializatory, o wysokim współczynniku przepuszczalności oraz - jeżeli można pomóc większej liczbie pacjentów, co ma istotne znaczenie zwłaszcza w krajach uboższych.

5.3. WPŁYW REUTYLIZACJI DIALIZATORÓW NA BIOZGODNOŚĆ BŁON DIALIZACYJNYCH

Przewlekła hemodializoterapia stanowi istotny czynnik odpowiedzialny za aktywację procesu zapalnego – a za element odgrywający najistotniejszą rolę w stymulowaniu odpowiedzi immunologicznej uważa się rodzaj zastosowanej błony dializacyjnej. Pod wpływem kontaktu z błonami dializacyjnymi (zwłaszcza wykonanymi z niemodyfikowanej celulozy) dochodzi do zwiększonej ekspresji cząstek adhezyjnych na powierzchni komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) oraz wydzielania przez te komórki szeregu prozapalnych cytokin (m.in. IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF α i MCP-1) a także licznych czynników wzrostowych [60, 171]. IL-1, TNF α – a przede wszystkim IL-6 - należą do cytokin, które odgrywają kluczową rolę w patogenezie systemowej odpowiedzi zapalnej (SIRS), będącej odpowiedzią ustroju na kontakt z bioniezgodnymi tworzywami [60].

W aktualnym piśmiennictwie można znaleźć sprzeczne informacje dotyczące problematyki biozgodności leczenia nerkozastępczego - a zwłaszcza danych charakteryzujących błony dializacyjne. Zdaniem niektórych autorów, błony o niskim stopniu biozgodności - które aktywują na drodze alternatywnej układ dopełniacza - są odpowiedzialne za zwiększoną produkcję cytokin oraz ich receptorów [22, 72, 156, 192]. W innych doniesieniach nie potwierdzono tych spostrzeżeń [2, 90, 108].

W surowicy chorych poddawanych hemodializoterapii stężenia IL-6 są znamienne wyższe w porównaniu do wartości stwierdzanych u chorych dializowanych otrzewnowo, u chorych z PNN lecz pozostających jeszcze w okresie przeddializacyjnym a także w populacji ludzi zdrowych [23, 70, 117, 170].

Problem biozgodności błon dializacyjnych dyskutowany jest już od wielu lat. Z uwagi na fakt, że indukcja sekrecji cytokin jest powszechnie zaakceptowanym parametrem oceny stopnia biozgodności różnych typów błon dializacyjnych [60], w niniejszej pracy monitorowano zmiany stężeń niektórych z nich w trakcie rutynowego leczenia powtarzaną hemodializą, używając standardowo reutilizowanych dializatorów.

Średnia wartość IL-6 w grupie kontrolnej w niniejszym badaniu wynosiła 4,9 pg/ml, natomiast średnia wartość IL-6 w okresie przed rozpoczęciem sesji hemodializy u wszystkich 10 pacjentów poddanych badaniu była 3 – krotnie większa – wynosiła bowiem 14,8 pg/ml. Jednak po upływie 2 godzin od rozpoczęcia zabiegu HD średnia wartość IL-6 u wszystkich 10 pacjentów poddanych badaniu wynosiła 20,8 pg/ml – zatem była ponad 4 – krotnie większa w porównaniu do grupy kontrolnej. Ma to istotne znaczenie prognostyczne, gdyż wiele danych

w piśmiennictwie wskazuje, że wysokie stężenia IL-6 są stowarzyszone z niekorzystnym rokowaniem tych chorych [132].

Potencjalne przyczyny zwiększonego stężenia IL-6 u chorych z PNN związane są z utratą funkcji własnych nerek, mocznicą *per se* oraz leczeniem nerkozastępczym. U chorych z niskimi wartościami klirensu nerkowego, jeszcze przed wdrożeniem leczenia nerkozastępczego - można odnotować laboratoryjne objawy zaburzeń w zakresie układu immunologicznego, co może prowadzić do wniosku, że pogorszenie funkcji nerek niezależnie od innych czynników związane jest ze zwiększeniem stężenia cytokin w surowicy krwi [37, 133]. Bolton i wsp. wykazali, że stężenie endogennej kreatyniny jest jedynym zidentyfikowanym czynnikiem powiązanim ze stężeniem IL-6 w grupie pacjentów w okresie przeddializacyjnym oraz w grupie już dializowanych chorych [16]. Upośledzony klirens nerkowy cytokin może być jedną z przyczyn leżących u podstaw tego zjawiska. Rzeczywiście, u chorych z PNN stwierdza się mniejsze wydzielanie receptora IL-6 w moczu aniżeli w grupie kontrolnej [114]. Ponieważ wraz z pogorszeniem funkcji nerek zmniejszeniu ulega również klirens cytokin – można uznać, że cytokiny - obok już znanych – stanowią kolejną grupę toksyn mocznicowych [44, 169].

Niezwykle istotnym problemem pozostaje odpowiedź na pytanie, czy IL-6 lub inna relatywnie łatwo oznaczalna laboratoryjnie cytokina, czy też jej receptor lub indukowane cytokinami białko - mogą służyć jako wiarygodny marker stopnia biozgodności błony dializacyjnej oraz oceny ryzyka śmiertelności w populacji dializowanych pacjentów?

Próby wykorzystania cytokin do badań nad stopniem biozgodności poszczególnych rodzajów błon dializacyjnych podjął się Yan i wsp. Koordynowany przez niego zespół próbował odpowiedzieć na pytanie, czy IL-6 i IL-8 mogą spełniać rolę markera stopnia biozgodności danego typu dializatora? Autorzy poddali badaniu dializatory o niskim stopniu biozgodności (trójoctan celulozy, hemofan) oraz o wysokim stopniu biozgodności (polisulfon), oceniając stężenie wymienionych cytokin przed i po zabiegu hemodializy. Uzyskane wyniki osoczowych stężeń wymienionych interleukin były znamienne wyższe w grupie chorych dializowanych przy wykorzystaniu błon o niskim stopniu biozgodności aniżeli w grupie chorych dializowanych przy użyciu błon polisulfonowych, czy też w grupie chorych z PNN w okresie przeddializacyjnym. Nie odnotowano natomiast istotnych różnic pomiędzy osoczowym stężeniem badanych cytokin pomiędzy chorymi dializowanymi przy użyciu błon polisulfonowych a chorymi z PNN lecz jeszcze w okresie przeddializacyjnym a także grupą kontrolną, co potwierdza bardzo wysoką biozgodność tworzywa polisulfonowego [200].

Wynik tego badania jest zgodny z wynikami uzyskanymi w obecnej pracy (praktyczny brak pobudzenia monocytów u chorych z grupy dializatorów polisulfonowych - średni przyrost IL-6 wynoszący zaledwie 0,5 pg/ml), które mogą stanowić poważny argument potwierdzający bardzo wysoki stopień biozgodności polimeru polisulfonowego. Natomiast w przeciwieństwie do wyników niniejszej pracy, które wykazały istotny wzrost stężenia IL-6 po 2 godzinach trwania zabiegu, w przypadku dializy wykonywanej na dializatorach kuprofanowych (średni przyrost IL-6 wynoszący 9,6 pg/ml) - Yan nie odnotował różnic w stężeniu wymienionych cytokin pomiędzy wartościami przed i po sesji hemodializy, również w przypadku dializatorów biozgodnych.

Niemniej jednak wyniki uzyskane przez Yan'a i wsp. potwierdzają, że osoczowe stężenia IL-6 i IL-8 u hemodializowanych są powiązane z typem zastosowanej błony dializacyjnej i że można je wykorzystywać jako markery oceny stopnia ich biozgodności.

Oceny stężeń IL-6 w surowicy chorych hemodializowanych przy użyciu błon o różnym stopniu biozgodności dokonali także Kaizu i wsp. Badacze ci wykazali, że przeddializacyjne stężenie IL-6 u wszystkich chorych hemodializowanych, niezależnie od rodzaju użytej błony (11,7 pg/ml), było statystycznie znamienne większe od stwierdzonego u zdrowych ochotników (< 0,6 pg/ml). Analiza regresji wielokrotnej wykazała, że stężenie IL-6 oceniane przed sesją hemodializy korelowało z czasem leczenia nerkozastępczego, wiekiem chorych oraz tworzywem, z którego wykonano błony dializacyjne, gdzie w przypadku błon celulozowych stężenie IL-6 przed sesją HD było znamienne większe aniżeli w przypadku błon syntetycznych [82].

Podobną zależność pomiędzy stężeniem IL-6 a wiekiem chorych można zauważyć również w niniejszej pracy. W grupie chorych, dializowanych przy użyciu błon kuprofanowych, których średnia wieku stanowiła 18 lat – średnie przeddializacyjne stężenie IL-6 wynosiło 6,7 pg/ml, natomiast w grupie chorych dializowanych przy użyciu błon polisulfonowych, których średnia wieku stanowiła 54,2 lat - średnie przeddializacyjne stężenie IL-6 wynosiło aż 17,9 pg/ml, przy czym różnica ta była istotna statystycznie.

Analogicznie analizując średnie wartości stężeń TNF α uzyskanych w obecnej pracy – również stwierdzono znamienne statystycznie różnicę w stężeniach tej cytokiny pomiędzy młodszą grupą chorych dializowanych przy wykorzystaniu błon kuprofanowych a starszymi chorymi, dializowanymi na biozgodnych błonach polisulfonowych (3,5 vs 5 pg/ml).

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy - a także wyniki przytoczonych powyżej doniesień zaczerpniętych z piśmiennictwa – potwierdzają wysoką, wręcz idealną biozgodność błon polisulfonowych. Teza ta jest jednak kontrowersyjna w świetle wyników innych autorów.

Caglar i wsp. monitorowali stężenie IL-6 w surowicy chorych dializowanych przy użyciu biozgodnych błon polisulfonowych *high-flux* przed rozpoczęciem zabiegu hemodializy, w czasie jego trwania oraz 2 godziny po jego zakończeniu – wykazując, że jakkolwiek wzrost stężenia IL-6 w porównaniu do wartości wyjściowych (12 pg/ml) w czasie sesji hemodializy był niewielki (zaledwie o 14%; 13,6 pg/ml), to jednak stężenie tej cytokiny istotnie statystycznie wzrosło po zakończeniu sesji HD (o 68%; 20 pg/ml) w porównaniu do wartości wyjściowych. Zdaniem autorów jest to mocny dowód na istnienie opóźnionej odpowiedzi zapalnej związanej z zabiegiem HD pomimo wykorzystania tworzywa o bardzo wysokim stopniu biozgodności [21].

Podobny rezultat pobudzenia monocytów (pomimo stosowania wysoce biozgodnych błon) uzyskali Raj i wsp., którzy monitorowali profil wydzielania wybranych cytokin (IL-6 i TNF α), pobierając próbki krwi przed sesją HD oraz na 10 minut przed jej zakończeniem. Dializa przeprowadzana była przy wykorzystaniu błony polisulfonowej *high-flux*. Wartości IL-6 wzrosły z poziomu 7,5 do 27,8 pg/ml (grupa kontrola: 4,2 pg/ml) natomiast stężenia produktów aktywacji układu dopełniacza oraz TNF α nie uległy istotnej statystycznie zmianie (1,01 do 1,02 pg/ml; grupa kontrolna: 0,46 pg/ml) [146]. Podobne rezultaty, pod postacią braku zmiany stężenia TNF α w czasie sesji HD zarówno przy użyciu błony kuprofanowej jak i polisulfonowej, uzyskano w niniejszej pracy. Analizując wyniki badania przeprowadzonego przez Raj i wsp. [146] zwraca również uwagę duża zbieżność uzyskanych przez tych autorów wartości stężeń badanych cytokin - z wynikami uzyskanymi w obecnej pracy.

Przytoczone powyżej rezultaty przeprowadzonych w ostatnich latach badań skłaniają do zadania pytania, która z cytokin: IL-6 czy TNF α jest bardziej czułym i swoistym markerem stopnia biozgodności dializatorów? Czy też, aby uzyskać pełny obraz stanu immunologicznego pacjenta, należy równolegle monitorować stężenia obydwu tych cytokin? Próby znalezienia odpowiedzi na te pytania podjęli się Hoffmann i wsp., którzy podobnie jak w niniejszej pracy - oceniali stopień biozgodności błon kuprofanowych i polisulfonowych przy pomocy monitorowania stężeń IL-6 i TNF α . Wykazali oni, że stężenia obydwu badanych cytokin były istotnie statystycznie wyższe u wszystkich chorych hemodializowanych w porównaniu do grupy kontrolnej. Wartości wyjściowe cytokin przed rozpoczęciem hemodializy nie różniły się istotnie statystycznie względem siebie. Niemniej jednak, po 4 godzinach trwania sesji HD przy użyciu dializatorów kuprofanowych odnotowano znamienne statystycznie wzrost stężenia TNF α , natomiast w przypadku błon polisulfonowych – wzrost był tylko nieznaczny. Należy podkreślić, że autorzy ci nie stwierdzili zmian stężeń innych

badanych markerów, w tym również IL-6, co jednak mogło być efektem dużego odchylenia standardowego w tym badaniu [72].

Wyniki uzyskane przez Hoffmanna i wsp. [72] różnią się od cytowanych uprzednio doniesień a także różnią się od wyników uzyskanych w niniejszej pracy, w której obserwowano wzrost stężenia IL-6 po 120 minutach trwania zabiegu HD z wykorzystaniem błon kuprofanowych, w porównaniu do stężeń oznaczanych przed sesją HD, przy jednoczesnym braku zmiany stężenia TNF α .

Z kolei Roccatello i wsp. badali stężenie TNF α w surowicy chorych hemodializowanych przy użyciu błon wykonanych z różnych tworzyw, pobierając próbki krwi w różnych okresach czasu podczas sesji HD. W porównaniu do stężenia TNF α w grupie kontrolnej - przeddializacyjne wartości TNF α u wszystkich badanych przez nich chorych były znamienne wyższe, niezależnie od rodzaju stosowanego dializatora. Niemniej jednak, istotny statystycznie przyrost wartości TNF α odnotowano wyłącznie w przypadku błon kuprofanowych [150].

W obecnej pracy nie wykazano znamiennej różnicy w zakresie wartości stężeń TNF α oznaczanych przed i po 90 minutach trwania sesji HD w żadnej z badanych grup. Przyczyna tego zjawiska być może uwarunkowana jest zaburzeniem w zakresie wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału zależnego od receptorów Toll – podobnych w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej u dializowanych chorych z PNN.

Przewlekła aktywacja komórek immunokompetentnych w połączeniu z utratą równowagi pomiędzy cytokinami prozapalnymi a ich swoistymi inhibitorami jest w głównej mierze odpowiedzialna za zaburzenia w obrębie układu immunologicznego chorych z PNN [36, 85].

Układ immunologiczny chorych z PNN z jednej strony jest niezwykle aktywny w aspekcie reakcji na obce materiały stosowane podczas zabiegów hemodializ lecz z drugiej strony wykazuje cechy upośledzenia swojej funkcji w ramach prawidłowej, fizjologicznej odpowiedzi immunologicznej [3].

Przewlekły stan zapalny występujący u pacjentów dializowanych, który najtrafniej określa termin SIRS [21], powstaje na skutek współdziałania dwóch zasadniczych czynników: upośledzonej odpowiedzi immunologicznej chorego ze schyłkową niewydolnością nerek oraz przewlekłego pobudzania układu immunologicznego pacjenta w czasie zabiegów hemodializ [3] (p. ryc. 92).

Do czynników wpływających na utrzymywanie się przewlekłego stanu zapalnego u chorych z PNN należą reakcje biozgodności związane z leczeniem nerkozastępczym, upośledzona funkcja układu immunologicznego, pierwotna choroba nerek, związane z mocznicą stres

oksydacyjny i karbonylowy, stosowane leki (żelazo, erytropoetyna), indywidualne uwarunkowania genetyczne, hiperlipidemia, przewlekłe zakażenia (*Chlamydia pneumoniae*) ale także kumulacja AGE, nadciśnienie tętnicze, przeciążenie płynowe oraz zmniejszony klirens nerkowy cytokin prozapalnych [3, 133].

Monocyty, obok komórek typu NK i limfocytów T – należą do grupy tzw. jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC), które odgrywają istotną rolę w procesie odpowiedzi ustroju na bioniezgodne czynniki i są zaliczane do komórek wydzielających cytokiny podczas zabiegu hemodializy [118]. Na komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (w tym na monocytach) zlokalizowane są receptory Toll – podobne (TLR), należące do nadrodziny receptorów rozpoznających wzorce (PRR). Na skutek pobudzenia TLR dochodzi do indukcji dalszych dróg wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału oraz aktywacji odpowiedzi immunologicznej w komórce.

Rodzina receptorów Toll – podobnych w ostatnim okresie czasu wzbudziła ogromne zainteresowanie immunologów, jako nowe zagadnienie odporności nieswoistej. TLR odgrywają zasadniczą rolę w procesie rozpoznawania tzw. „podpisów molekularnych”, świadczących o zakażeniu danym rodzajem patogenu. Wrodzona odporność nieswoista ukierunkowana jest na określone „konserwatywne” filogenetycznie wzorce antygenowe nazywane „podpisami molekularnymi” (PAMPs) [111]. PAMPs charakteryzują się trzema cechami, które powodują, że stanowią one idealny punkt docelowy dla wrodzonej odporności nieswoistej. „Podpisy molekularne” wytwarzane są wyłącznie przez komórki drobnoustrojów lecz nie przez komórki gospodarza. Zaliczają się do nich m.in.: lipopolisacharyd (LPS), lipoproteiny, peptydoglikany oraz kwas lipoteichoowy. Określone podpisy molekularne pozostają niezienne w obrębie danej klasy drobnoustrojów. Dzięki temu wystarczy ograniczona liczba rodzajów PRR, aby zabezpieczyć możliwość detekcji zakażenia każdym typem patogenu. Ponadto PAMPs są absolutnie niezbędne dla celów przeżycia danego mikroorganizmu. Mutacje w obrębie PAMP są letalne dla danego drobnoustroju – dlatego też nie ma możliwości powstawania mutacji w ich obrębie [111].

TLR zaliczane są do receptorów przezbłonowych typu 1 i zbudowane są z dwóch elementów strukturalnych: z zewnątrzkomórkowej bogatej w reszty lucynowe domeny oraz wewnątrzkomórkowego fragmentu TIR, który zabudowany jest z kilku „konserwatywnych” filogenetycznie modułów białkowych występujących u wielu gatunków zwierząt i roślin [55]. Do tej pory poznano i scharakteryzowano 10 typów TLR.

Pod wpływem pobudzenia - TLR oddziałują ze swoistymi białkami łącznikowymi budującymi drogi wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału. Do chwili obecnej odkryto 5 takich białek: MyD88, Mal czyli TIRAP, Trif, TRAM oraz SARM.

Pierwszym opisanym receptorem Toll – podobnym był TLR 4 [112]. Występuje on na wielu komórkach głównie układu immunologicznego w tym na makrofagach i monocytach. Zasadniczą rolą TLR 4 jest wewnątrzkomórkowe przekazywanie sygnału po stymulacji lipopolisacharydem bakteryjnym (LPS – endotoksyna, podstawowy składnik zewnętrznej warstwy ściany komórkowej bakterii Gram – ujemnych) [74, 138, 145].

Należy pamiętać, że celulozowe błony dializacyjne (do których należą błony kuprofanowe) zbudowane są z powtarzających się podjednostek polisacharydowych, które bardzo przypominają swoją strukturą lipopolisacharydowe ściany bakterii i grzybów.

Ponadto w dializacie oprócz bakterii znajdują się także endotoksyny bakteryjne (tzw. *CIS - cytokine inducing substances*). Komórki bakterii są co prawda zbyt duże, aby mogły przeniknąć poprzez błonę, lecz wielkość cząsteczek endotoksyn bakteryjnych (LSP) jest już znacznie mniejsza i teoretycznie mogą one swobodnie przenikać przez pory błony dializacyjnej w mechanizmie dyfuzji lub konwekcji.

Przyczyna zaobserwowanego z niniejszej pracy zmniejszonego wydzielania TNF α przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC) w przypadku chorych mocznicowych może leżeć w czynnościowej dezaktywacji monocytów na skutek zmniejszonej ekspresji wewnątrzkomórkowej kinazy IRAK-1, leżącej na szlaku przekazywania sygnału od TLR 4 poprzez białko łącznikowe MyD88.

Podobne rezultaty braku sekrecji TNF α przy zachowanym prawidłowym wydzielaniu IL-6 przez PBMC zaobserwowano u pacjentów z zaawansowaną chorobą nowotworową (III i IV stadium raka żołądka) [167]. Zaawansowana choroba nowotworowa (podobnie jak stan przewlekłej toksemii mocznicowej) zalicza się do stanów nadmiernej stymulacji układu immunologicznego oraz upośledzonej odpowiedzi immunologicznej [35, 204].

Oceny wydzielania prozapalnych cytokin (m.in. TNF α i IL-6) przez PBMC pobranych od chorych onkologicznych w odpowiedzi na stymulację LPS dokonali Siedlar i wsp. W badaniu tym dokonano także próby skorelowania stopnia ekspresji kinazy IRAK-1 w PBMC ze stężeniem wydzielanych przez te komórki poszczególnych cytokin.

Wydzielanie TNF α przez monocyty pobrane od chorych będących w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej (III i IV stadium) w odpowiedzi na stymulację LPS było statystycznie istotnie zmniejszone w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,05$), przy niezaburzonym wydzielaniu IL-6. Zmniejszone wydzielanie TNF α przez monocyty

skorelowane było ze zmniejszonym stopniem ekspresji kinazy IRAK-1 w tych komórkach. Brak ekspresji kinazy IRAK-1 zaobserwowano wyłącznie u chorych w III i IV stadium zaawansowania choroby nowotworowej. W przypadku monocytów z prawidłową ekspresją IRAK-1 (stadium I i II choroby) wydzielanie TNF α było porównywalne względem grupy kontrolnej [167].

Kinaza IRAK-1 jest uniwersalnym białkiem kontrolnym monocytów związanym z białkiem łącznikowym MyD88 leżącym na szlaku wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału od TLR 4 do TRAF 6 i czynnika jądrowego κ B (NF κ B). Ponadto IRAK-1 jest kluczowym białkiem sygnałowym dla syntezy wielu cytokin prozapalnych aktywowanych między innymi przez NF κ B w odpowiedzi na stymulację receptorów typu TLR zlokalizowanych na monocytach i makrofagach [93, 102, 121, 177]. Zatem jej aktywność ściśle związana jest z nasilaniem lub też hamowaniem procesu zapalnego [167].

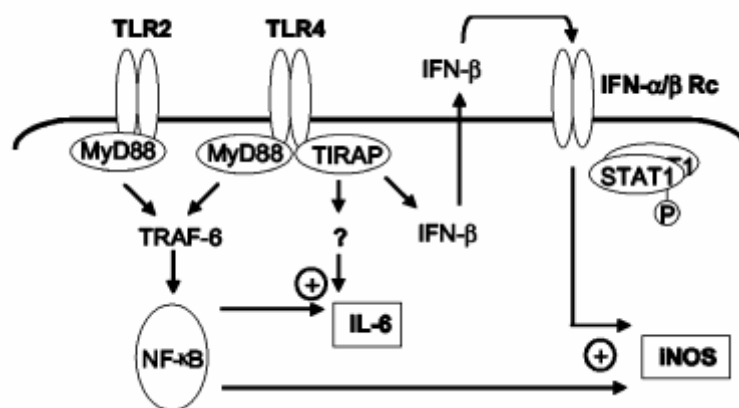
Chorzy poddawani leczeniu nerkozastępczemu - należą do pacjentów, u których występuje przewlekły stan pobudzenia immunologicznego (m.in. zespół MIA). Aby w takiej sytuacji zapobiec nadmiernej i zbyt długotrwałej odpowiedzi immunologicznej gospodarza oraz doprowadzeniu do zbyt szybkiego „wyczerpania się” komórek immunokompetentnych - w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej dochodzi do zmniejszenia aktywności kinazy IRAK-1, co prowadzi do wytworzenia swoistej tolerancji immunologicznej wobec niektórych antygenów bakteryjnych [35, 204].

Indukcja wydzielania cytokin prozapalnych takich jak TNF α i IL-6 w komórkach typu PBMC w odpowiedzi na różne bodźce stymulujące (np. LPS) uzależniona jest przede wszystkim od aktywacji receptorów TLR 4 oraz kompleksu IRAK-1 / NF κ B, stanowiącego zasadnicze ogniwo drogi przekazywania sygnału w tych komórkach [103, 173]. Z uwagi na fakt, że IRAK-1 jest główną molekułą w kaskadzie przekazywania sygnału w monocytach - zatem zmniejszenie jej aktywności hamuje dalsze przekaźnictwo sygnału a przez to hamuje syntezę i sekrecję TNF α . Innymi słowy - obniżona sekrecja TNF α przez pobudzone PBMC ściśle związana jest z obniżoną ekspresją kinazy IRAK-1 w tych komórkach.

Schilling i wsp. udowodnili, że w komórkach jednojądrzastych kaskada przekazywania sygnału rozpoczynająca się od aktywacji receptora TLR 4 (której punktem końcowym jest sekrecja IL-6) może ulegać rozgałęzieniu na poziomie powyżej kompleksu MyD88 - IRAK-1. Ponieważ sygnał od TLR 4 może być przekazywany całkowicie niezależnie od MyD88 – gdyż istnieje droga poprzez białko łącznikowe MyD88 adapter – like (Mal) czyli TIRAP - tłumaczy to zjawisko niezaburzonej sekrecji IL-6 przy zablokowaniu wydzielania TNF α przez monocyty pozbawione aktywnej formy IRAK-1 [162].

Zatem można przypuszczać, że w przypadku przewlekłych stanów zapalnych przekazywanie sygnału dla wydzielania cytokin prozapalnych w PBMC ulega zaburzeniu na poziomie poniżej kompleksu MyD88 / IRAK-1 [167].

Brak narastania stężeń TNF α w surowicy chorych hemodializowanych (przy obserwowanym zwiększaniu się stężeń IL-6) można wobec tego tłumaczyć faktem, że u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek dochodzi do zmniejszenia aktywności kompleksu MyD88 / IRAK-1 w monocytach co skutkuje zahamowaniem dalszej kaskady prowadzącej do transkrypcji i translacji TNF α .



Ryc. 92. Sugerowany model odrębnych kaskad sekrecji TNF (NF κ B) i IL-6. Kaskada TLR 2 zależna od MyD88 – IRAK-1 oraz kaskada TLR 4 zależna od TIRAP / Mal. TRAF 6 – TNF α receptor associated factor 6; INOS – inducible NO synthase (indukowana syntaza NO) [162] – przedruk za zgodą autorów.

Prawdopodobną przyczyną niezaburzonej sekrecji IL-6 (przy równoległym zahamowaniu wydzielania TNF α przez monocyty) jest możliwość istnienia alternatywnej drogi wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału niezależnej od kompleksu MyD88 / IRAK-1, natomiast zależnej od kaskady białka łącznikowego MyD88 adapter – like czyli TIRAP.

Do tej pory nie poznano mechanizmu blokowania aktywności IRAK-1. Nie wiadomo również, czy proces zmniejszenia ekspresji jest kontrolowany na poziomie transkrypcji czy też translacji tego białka?

Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy oraz powyżej przytoczonych informacji – można wysunąć tezę, że najdokładniejszą metodą oceny stopnia biogodności dializatorów może być oznaczanie stężeń zarówno IL-6 jak i TNF α oraz aktywności kinazy IRAK-1 w PBMC chorych hemodializowanych. Zatem, kolejnym krokiem poszerzającym

wyniki uzyskane w obecnej pracy, mogłaby być próba oceny ekspresji kinazy IRAK-1 w komórkach jednojądrzastych chorych z przewlekłą niewydolnością nerek oraz analiza korelacji pomiędzy stopniem aktywności IRAK-1 a sekrecją pro- i przeciwzapalnych cytokin przez monocyty i ich związek z np. chorobowością i przeżyciem chorych przewlekle hemodializowanych.

Poprawa stopnia biozgodności błon dializacyjnych miała być (obok względów ekonomicznych) jednym z głównych i najważniejszych celów reutilizacji dializatorów. Postulowano, że kolejne użycie tej samej błony dializacyjnej jest korzystniejsze dla pacjenta ze względu na ochronne działanie białek osadzających się na wewnętrznej powierzchni błony filtracyjnej.

Potwierdzeniem tej tezy są wyniki badań uzyskane przez Pietrzyka i wsp., w których wykorzystując technikę mikroskopu immunofluorescencyjnego udowodniono, że wielokrotne użycie dializatora kuprofanowego - a także polisulfonowego - powoduje osadzanie się na wewnętrznej powierzchni kapilar i we wnętrzu ich ścian depozytu białkowego, składającego się głównie z fibrynogenu, składowej C4 dopełniacza, immunoglobuliny G oraz albuminy [125]. Z drugiej jednak strony wiadomo, że kwas nadoctowy jest środkiem silnie utleniającym, który w trakcie procesu reutilizacji tylko częściowo usuwa białka osadzone na powierzchni błony. Pozostałe proteiny ulegają denaturacji i utlenieniu, co prowadzi do powstania ujemnych ładunków na powierzchni błony. W trakcie kolejnego użycia dializatora zamiast spodziewanej poprawy biozgodności dochodzi nie tylko do intensywnej aktywacji monocytów i gwałtownego wydzielania cytokin (m.in. IL-1 β , IL-6) ale także do aktywacji czynnika Hagemana, wydzielania kallikreiny i innych kinin [91].

W obecnej pracy, w której dokonano próby weryfikacji stanowiska o pozytywnym wpływie reutilizacji dializatorów na stopień ich biozgodności - nie osiągnięto poprawy biozgodności błon kuprofanowych ocenianej metodą monitorowania stężeń IL-6 i TNF α . Zmiany stężeń IL-6 (Δ IL-6: czyli różnica pomiędzy stężeniem tej cytokiny oznaczanym w czasie t_{120} a t_0) po kolejnych reutilizacjach błony kuprofanowej w porównaniu do zmiany stężenia IL-6 dla nowej błony kuprofanowej – nie były znamienne statystycznie po żadnej krotności reutilizacji dializatora. Zatem reutilizacja dializatorów kuprofanowych kwasem nadoctowym nie wpłynęła w sposób istotny na zmianę stopnia ich biozgodności ocenianego metodą monitorowania stężeń IL-6. Podobny wynik braku znamienności statystycznej uzyskano w przypadku analizy różnicy stężeń TNF α (Δ TNF α : czyli różnicy pomiędzy stężeniem tej cytokiny oznaczanym w czasie t_{90} a t_0) po kolejnych reutilizacjach błony kuprofanowej w porównaniu do zmiany stężenia TNF α dla nowego dializatora.

Niewielu autorów dokonywało oceny stopnia biogodności błony dializacyjnej metodą monitorowania wartości stężeń cytokin w zależności od liczby reutilizacji dializatora. Należeli do nich Qian i wsp., którzy dokonywali pomiarów stężeń TNF α oraz IL-6 w surowicy chorych dializowanych przy wykorzystaniu między innymi dializatorów polisulfonowych i kuprofanowych. Wniosek wypływający z tego badania pozostaje jednak w całkowitej sprzeczności z wynikami uzyskanymi w obecnej pracy. Rezultaty uzyskane przez Qian i wsp. sugerują, że reutilizacja dializatora formaliną powoduje mniejsze pobudzenie układu immunologicznego opisane osoczowym stężeniem badanych cytokin [143].

W nieco odmienny sposób ujęli ten problem Tkaczyk i wsp., którzy wykorzystali fakt, że czynność płytek krwi może być jednym z czułych wskaźników biogodności błon dializacyjnych. W badaniu oceniono wpływ procesu reutilizacji dializatorów na funkcję płytek krwi. Przeprowadzono ocenę prospektywną badając aktywację (poprzez cytometryczną analizę odsetka mikroplatek, agregatów płytkowych oraz ekspresji wybranych cząstek powierzchniowych) i reaktywność (poprzez zmianę ekspresji cząstek w odpowiedzi na submaksymalne pobudzenie trombiną) płytek krwi u chorych hemodializowanych w zależności od kolejnego użycia dializatora. Niestety, analizie poddano zaledwie dwa kolejne 4 - godzinne zabiegi, z użyciem dializatora nowego oraz po pierwszej reutilizacji. Aktywację i reaktywację płytek badano przed rozpoczęciem zabiegu oraz po 1 i 4 godzinach jego trwania.

Przeprowadzone badania wykazały, że błona dializacyjna po jednokrotnej reutilizacji powoduje podobne zmiany aktywacji i reaktywności płytek jak dializator użyty po raz pierwszy – zatem stopień jej biogodności nie uległ zmianie [178].

Analizując wyniki uzyskane w niniejszej pracy, w której średnie stężenie IL-6 obliczone dla wszystkich badanych chorych hemodializowanych było prawie 4-krotnie wyższe od poziomu tej cytokiny stwierdzonego w grupie kontrolnej, natomiast średnie stężenie TNF α w grupie objętych badaniem pacjentów - przekraczało 5 - krotnie stężenie stwierdzone w grupie kontrolnej - a także wyniki przytoczonych powyżej doniesień piśmiennictwa mówiących o stopniu pobudzania komórek immunokompetentnych przez poszczególne rodzaje błon dializacyjnych - nie należy zapominać o konsekwencjach klinicznych takiej sytuacji.

Sięgając po błonę dializacyjną, która silnie aktywuje odpowiedź immunologiczną ustroju należy mieć świadomość, że wysokie stężenia prozapalnych cytokin (w tym IL-6 i TNF α) przyczyniają się do znacznego pogorszenia rokowania chorych hemodializowanych poprzez negatywny wpływ na utrzymanie resztkowej funkcji nerek, na stan odżywienia białkowo – energetycznego a także na częstość i nasilenie powikłań infekcyjnych.

Cytokiny takie jak: IL-1, IL-6, TNF α i FGF odrywają zasadniczą rolę w pobudzaniu czynności fibroblastów – ostatniego ogniwa w procesie nieodwracalnego włóknienia i bliznowacenia mięszu nerek, co przyczynia się do szybszej utraty resztkowej funkcji tego narządu [124, 165, 171]. Hartmann i wsp. dokonali oceny wpływu stopnia biozgodności stosowanych w leczeniu nerkozastępczym błon dializacyjnych (kuprofanowych i polisulfonowych) na progresję utraty resztkowej funkcji nerek u chorych w stadium schyłkowej ich niewydolności. Diureza oraz klirens kreatyniny uległ istotnemu statystycznie pogorszeniu w obydwu grupach chorych, lecz proces ten przebiegał gwałtowniej u pacjentów dializowanych przy użyciu dializatorów kuprofanowych aniżeli u pacjentów z grupy dializatorów polisulfonowych - po okresie 12 - miesięcznej obserwacji wartości klirensu kreatyniny oraz objętości dobowej diurezy były 2 - krotnie większe u chorych z grupy dializatorów polisulfonowych [65].

Omawiane, prozapane cytokiny (TNF α i IL-6) hamują łaknienie na drodze ośrodkowej poprzez bezpośredni wpływ na podwzgórze, ponadto stymulują procesy katabolizmu w mięśniach, hamują syntezę albuminy w wątrobie, nasilają spoczynkowe wydatkowanie energii oraz hamują anaboliczny efekt hormonów np.: insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1) [135, 171].

Skomplikowany łańcuch wzajemnych zależności pomiędzy kluczowym elementem, jakim jest błona dializacyjna a stanem odżywienia, katabolizmem białkowym, przeżywalnością oraz resztkową funkcją nerek podsumowują badania Parkera i wsp., w których wykazano korelację pomiędzy powolnym, aczkolwiek stopniowym przyrostem beztłuszczowej masy ciała u chorych dializowanych przy wykorzystaniu błon o wysokim stopniu biozgodności, u których resztkowa funkcja nerek była dłużej zachowana – w porównaniu do chorych dializowanych przy użyciu błon biozgodnych, u których nie zaobserwowano przyrostu masy ciała - a ich resztkowa funkcja nerek uległa szybkiemu zanikowi [131].

Rezultaty badania Parkera i wsp. [131] wskazują wyraźnie, że rodzaj zastosowanej błony dializacyjnej ma w zasadzie decydujący wpływ na jakość życia chorych poddawanych terapii nerkozastępczej.

Pomimo ogromnego postępu, jaki dokonał się w ostatnich latach w dziedzinie dializoterapii, śmiertelność chorych przewlekłe dializowanych nadal pozostaje od 4 do 5 razy większa aniżeli w analogicznej wiekowo populacji ogólnej [7]. Cytokiny wydzielane podczas zabiegów hemodializ są czynnikami o postulowanym negatywnym wpływie na przeżycie i śmiertelność chorych z PNN leczonych nerkozastępczo [57, 78]. Na rokowanie pacjenta hemodializowanego oprócz wspomnianej już biozgodności i współczynnika

przepuszczalności błony dializacyjnej - mają także wpływ techniki dializacyjne, dawka dostarczonej dializy, klirens molekuł średnicząsteczkowych, rodzaj procesu reutilizacji dializatorów, stopień czystości dializatu, maszyny z kontrolowanym procesem ultrafiltracji a także status ośrodka dializacyjnego (*for profit* lub *non for profit*) [13]. Jednak elementem odgrywającym najważniejszą rolę w zapewnieniu bezpieczeństwa, wysokiej jakości oraz biogodności leczenia chorym hemodializowanym - pozostaje bez wątplenia rodzaj zastosowanej błony dializacyjnej [26, 114].

W aktualnym piśmiennictwie specjalistycznym opublikowano wyniki licznych badań oceniających wzajemne zależności pomiędzy parametrami immunologicznymi chorych przewlekle poddawanych hemodializoterapii, rodzajem stosowanych błon dializacyjnych a wynikami odległego przeżycia tych pacjentów.

Bologa i wsp. wykazali, że wysokie wartości stężenia IL-6 indukowane między innymi stosowaniem bioniezgodnych błon dializacyjnych to najsilniejszy czynnik prognostyczny niekorzystnego rokowania oraz poważnych powikłań w populacji chorych hemodializowanych. Badacze wykazali, że poprzez monitorowanie stężeń IL-6 i TNF α można prognozować stopień hipoalbuminemii i hipocholesterolemii u tych chorych oraz, że wzrost stężenia IL-6 o 1 pg/ml przyczynia się do wzrostu śmiertelności chorych hemodializowanych o 4,4% [15]. Monitorowanie wartości omawianych cytokin może zatem służyć jako właściwa metoda oceny odległego rokowania.

Kimmel i wsp. dokonali próby oceny wpływu stężeń poszczególnych cytokin w surowicy krwi na ryzyko względne śmiertelności chorych hemodializowanych. Trwającym około 3 lata wieloośrodkowym badaniem objęto 230 pacjentów. U wszystkich chorych średnie stężenie krążących cytokin było wyższe aniżeli w grupie kontrolnej. Analiza współczynników przeżycia pacjentów objętych badaniem wykazała, że ryzyko zgonu pacjentów dializowanych przy użyciu dializatorów syntetycznych oraz wykonanych z modyfikowanej celulozy było o 34% mniejsze w porównaniu do chorych dializowanych przy użyciu dializatorów kuprofanowych. Jednak na szczególną uwagę zasługuje wynik tego badania wskazujący, że podwojenie wartości stężeń krążącego TNF α związane było z 65%, a IL-6 z 56% wzrostem ryzyka zgonu w badanej populacji. Autorzy badania sugerują, że zwiększone stężenia IL-1, TNF α , IL-6 oraz IL-13 są ściśle związane ze wzrostem ryzyka względnego śmiertelności chorych hemodializowanych [89].

Natomiast Hornberger i wsp. wykazali mniejszą liczbę hospitalizacji i mniejszą śmiertelność w populacji chorych dializowanych przy użyciu błon polisulfonowych aniżeli błon kuprofanowych [73]. Podobnie Koda i wsp. odnotowali zmniejszenie wskaźnika śmiertelności

o 39% - po wdrożeniu do leczenia nerkozastępczego syntetycznych lub wykonanych z modyfikowanej celulozy błon *high-flux* w miejsce dializatorów *low-flux* wykonanych z niemodyfikowanej celulozy [92].

Wyniki powyższych doniesień niejako potwierdza rezultat prospektywnego badania koordynowanego przez Hakima i wsp. obejmującego ponad 6000 pacjentów, w którym wykazano ponad 25% zmniejszenie śmiertelności w grupie chorych dializowanych przy wykorzystaniu błon syntetycznych lub półsyntetycznych w porównaniu do błon niemodyfikowanych. Wyniki tego badania odsłoniły zastraszające dane wskazujące, że oczekiwana długość życia chorych dializowanych wynosi zaledwie około ¼ analogicznej wiekowo ogólnej populacji [63, 64].

Bez wątpienia stosowanie biozgodnych błon dializacyjnych związane jest z mniejszym odsetkiem powikłań oraz mniejszą śmiertelnością względem danych dotyczących niemodyfikowanych błon celulozowych. Ponadto brak jest danych, które potwierdzałyby korzystny wpływ celulozowych błon dializacyjnych na jakość życia i śmiertelność hemodializowanych chorych [63].

W świetle przedstawionych powyżej doniesień a także na podstawie własnych wyników uzyskanych w niniejszej pracy, w której przyrost stężeń IL-6 w trakcie dializy na nowym oraz kilkakrotnie reutilizowanym dializatorze kuprofanowym był znamieny statystycznie w każdym przypadku użycia dializatora (przy jednoczesnym braku wyraźnego pobudzenia monocytów w grupie chorych dializowanych na dializatorach polisulfonowych) - stosowanie biozgodnych błon dializacyjnych powinno być priorytetowym zaleceniem w kontekście jak najdłuższego uchronienia chorych przed wystąpieniem licznych, poważnych powikłań związanych z hemodializoterapią a także - zminimalizowania ich skutków. Blisko dwudziestokrotnie większy średni przyrost stężenia IL-6 (9,6 vs 0,5 pg/ml) u chorych dializowanych przy użyciu błon kuprofanowych w porównaniu do błon polisulfonowych świadczy o dużej bioniezgodności tych pierwszych.

Wyniki wielu badań, zdają się potwierdzać fakt, że decydującym o biozgodności czynnikiem pozostaje skład chemiczny polimerów, z których wykonywane są błony dializacyjne, a w szczególności struktura chemiczna warstwy mającej bezpośredni kontakt z krwią pacjenta. Być może jest to argument za zupełnym zaniechaniem użycia dializatorów celulozowych i zwrotowi ku błonom biozgodnym - niezależnie od techniki samej hemodializy.

Brak poprawy biozgodności błon kuprofanowych po procesie reutilizacji kwasem nadoctowym ocenianej metodą monitorowania stężeń IL-6 oraz TNF α stawia pod dużym znakiem zapytania celowość, bezpieczeństwo oraz kwestię etyczną takiego postępowania.

W ostatnich latach zainwestowano ogromne środki oraz wkład intelektualny w rozwój nowoczesnych i bezpiecznych dla chorego technik dializacyjnych i tworzyw do produkcji kapilar dializatorów. W dużej mierze wysiłek ten zaowocował poprawą wskaźników przeżywalności i jakości życia tych chorych. Niemniej należy pamiętać, że nie wszystkie kosztowne i nowoczesne błony są takie same. Dializatory polimetylmetakrylowe (PMMA) względnie słabo aktywują układ dopełniacza lecz z kolei w większym stopniu aktywują degranulację granulocytów aniżeli błony polisulfonowe. Z kolei błony poliakrylonitrylowe (PAN) indukują większą utratę aminokwasów w trakcie sesji HD aniżeli błony polisulfonowe czy PMMA [59, 77, 120, 199]. Nie należy również pomijać istotnej kwestii rodzaju fabrycznej sterylizacji filtrów oraz stopnia czystości bakteriologicznej dializatu [161, 163]. Dlatego też dobór odpowiedniego rodzaju dializatora dla każdego chorego powinien być indywidualny i uwzględniający nie tylko kwestie finansowe ale przede wszystkim stan kliniczny pacjenta.

Należy mieć świadomość, że na odległe rokowanie chorych przewlekle dializowanych mają wpływ zarówno dawka dializy jaką zaoferujemy pacjentowi - innymi słowy współczynnik przepuszczalności użytego filtra (*low vs high flux*) a także stopień biozgodności błony dializacyjnej. Obydwa wymienione czynniki mogą działać jako niezależni sprzymierzeńcy człowieka przewlekle dializowanego ale także mogą stać się pośrednią (lecz najistotniejszą) przyczyną zwiększonej chorobowości i śmiertelności w tej populacji chorych.

Po dokonaniu analizy rezultatów uzyskanych w niniejszej pracy oraz przytoczonych powyżej wyników licznych badań przeprowadzonych w ostatnich latach na całym świecie – wniosek, który się nasuwa jest tylko jeden: należy dążyć do jak najszerszego wdrażania do powszechnego leczenia nerkozastępczego wysokoprzepływowych i wysoce biozgodnych dializatorów, w miejsce niskoprzepływowych błon naturalnych.

Powołując się na argument dużych kosztów takiego wysoce biozgodnego i adekwatnego leczenia nerkozastępczego - nie wolno zapominać, że śmiertelność chorych przewlekle hemodializowanych nadal pozostaje wysoka (około 20% rocznie) - pomimo wyraźnego technicznego postępu w zakresie technik leczenia nerkozastępczego oraz intensywnych wysiłków poprawy tego wskaźnika [8, 15, 50, 66, 83, 169, 180].

* * *

Pomimo względnej skuteczności i dość wysokiego stopnia bezpieczeństwa współczesna hemodializoterapia długo jeszcze nie będzie w stanie zapewnić chorym parametrów oczyszczania w stopniu zbliżonym do tego, które zapewnia człowiekowi jego naturalny kłębuszek nerkowy.

Maksymalny, tygodniowy frakcjonowany klirens mocznika osiągnęty nawet u bardzo dobrze dializowanych pacjentów - wynosi zaledwie jedną szóstą fizjologicznego klirensu tej cząsteczki, zapewnianego przez zdrową, ludzką nerkę [201]. Niemniej jednak - oceniając stan toksemii mocznicowej chorego dializowanego nie wolno poprzestawać wyłącznie na monitorowaniu najprostszych związków niskocząsteczkowych - takich jak mocznik. Szereg substancji należących do grupy tzw. średnich cząsteczek oraz duże peptydy, które w warunkach fizjologii są wydalane lub metabolizowane przez zdrowe nerki - w przypadku chorego dializowanego nie są w całości usuwane z ustroju, co prowadzi do ich kumulacji i szeregu powikłań z tym związanych. Ponadto, szeroko rozpowszechnione wielokrotne użycie dializatorów nie przyczynia się do poprawy parametrów czynnościowych błon dializacyjnych a raczej do ich pogorszenia.

Poważne zaburzenia w obrębie układu immunologicznego chorego wywołane na skutek powtarzanego kontaktu krwi pacjenta z bioniezgodną powierzchnią błony dializacyjnej (pod postacią pobudzenia układu dopełniacza, komórek jednojądrzastych krwi obwodowej oraz sekrecji licznych prozapalnych cytokin) - dopełniają całości obrazu stanu klinicznego przeciętnego pacjenta poddanego przewlekłej hemodializoterapii.

Mając świadomość tych i wielu innych działań niepożądanych oraz zagrożeń związanych z terapią nerkozastępczą - należy dążyć do minimalizowania powikłań towarzyszących PNN - a nie do ich nasilania.

Współcześnie dostępne błony asymetryczne, chroniące chorych przez endotoksynami bakteryjnymi charakteryzują się doskonałym profilem biozgodności oraz większą średnicą porów, nie narażającą jednak dializowanych chorych na utratę ich własnych albumin. Intensywny postęp w technologii produkcji dializatorów pozwala na wykorzystanie w nich błon, które swoją nanostrukturą oraz parametrami czynnościowymi są zbliżone do naturalnego i idealnego wzorca – kłębuszka nerkowego.

Wyniki niniejszej pracy, w której posłużono się nowoczesnymi narzędziami badawczymi: AFM, analizą stężeń cytokin oraz precyzyjnie wyliczonym K_D dla markerów o różnych

masach cząsteczkowych - wskazują, że na przekór rygorystycznym uwarunkowaniom ekonomicznym warto zrezygnować z nieskutecznych w usuwaniu średnich cząsteczek, symetrycznych, bioniezgodnych, celulozowych błon dializacyjnych, których parametry ulegają pogorszeniu z każdą kolejną reutilizacją - a głównym wyborem powinny stać się dializatory wykonane z asymetrycznej, syntetycznej błony o wysokim współczynniku przepuszczalności, używane maksymalnie trzy-, czterokrotnie. Takie postępowanie powinno znaleźć swoje odzwierciedlenie w poprawie nienajlepszych obecnie wskaźników chorobowości i śmiertelności w tej populacji chorych.

Dotychczasowe wspólne wysiłki diabetologów i nefrologów powodują, że stale narasta liczba pacjentów poddawanych dializoterapii z powodu nefropatii cukrzycowej [158]. Jednocześnie obserwuje się stały proces starzenia się zarówno populacji pacjentów ze SNN jak i ogólnej populacji całego rozwiniętego świata. Stwarza to i stanowić będzie dodatkowe obciążenie dla budżetu ochrony zdrowia ze względu na występującą u tych pacjentów zwiększoną współchorobowość. W przypadku chorych dializowanych u jej podłoża może leżeć niska biozgodność hemodializy oraz przewlekłe niedodializowanie.

Należy dołożyć starań, aby dzięki działaniom profilaktycznym oraz postępowi w zakresie prewencji schorzeń nerek w znaczący sposób ograniczyć liczbę pacjentów, u których rozwinię się SNN, natomiast tych pacjentów, którzy już wymagają terapii nerkozastępczej leczyć w oparciu o wiarygodne i racjonalne wyniki badań wielośrodkowych a nie wyłącznie w oparciu o twarde kryteria ekonomiczne, które pojmowane wybiórczo (jak najniższy jednorazowy koszt zabiegu) prowadzą do wzrostu odległych kosztów leczenia.

6. WNIOSKI WYNIKAJĄCE Z PRACY

Na podstawie przeprowadzonych badań wysunięto następujące wnioski:

1.1. Szorstkość powierzchni wewnętrznej i zewnętrznej badanych błon dializacyjnych wyrażona jako średnia wartość RMS uwidacznia asymetryczną nanostrukturę błony polisulfonowej i symetryczną błony kuprofanowej.

1.2. Średnie wartości współczynnika zmienności dla RMS oraz wskaźniki dynamiki zmian dla RMS zarówno powierzchni wewnętrznych jak i zewnętrznych badanych błon świadczą o większej jednorodności i stabilności nanostruktury nowej i reutilizowanej błony polisulfonowej w porównaniu do błony kuprofanowej. Reutilizacja dializatorów kwasem nadoctowym nie wpływa jednak w sposób istotny na zmianę nanostruktury powierzchni badanych błon.

2. Kolejna reutilizacja kwasem nadoctowym badanych błon dializacyjnych nie wpływa w istotny sposób na klirensy mocznika, kreatyniny i kwasu moczowego (markery toksyn niskocząsteczkowych). Klirens kwasu foliowego (marker toksyn średnicząsteczkowych), w przypadku dializatora kuprofanowego istotnie statystycznie zmniejsza się po 4. i 5. reutilizacji, natomiast dla dializatora polisulfonowego już po 3. po czym zachowuje się stabilnie do 7. reutilizacji, po której następuje dalszy spadek jego wartości.

3. Uzyskane wartości klirensów substancji wzorcowej toksyn średnicząsteczkowych - świadczą, że liczba reutilizacji dializatorów kuprofanowych nie powinna przekraczać trzech, natomiast dializatorów polisulfonowych – siedmiu.

4.1. W grupie pacjentów dializowanych przy użyciu nowych i reutilizowanych błon kuprofanowych stwierdzono wysoce statystycznie znamienne większe (około 19 – krotnie) przyrosty stężenia IL-6 w porównaniu do chorych dializowanych przy użyciu kapilar polisulfonowych, co świadczy o bardzo niskim stopniu biozgodności błon kuprofanowych. Analogicznej zależności nie stwierdzono dla TNF α , którego stężenie nie ulegało zmianom w trakcie badania.

4.2. Reutilizacja badanych dializatorów kwasem nadoctowym nie poprawia stopnia ich biogodności ocenianej metodą monitorowania stężeń IL-6 i TNF α .

5. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy szorstkością powierzchni badanych błon dializacyjnych wyrażoną wartościami RMS a ich biogodnością wyrażoną wartościami stężeń IL-6 i TNF α .

7. PIŚMIENICTWO:

1. Ajura J.L., Kimmel P.L.: Choice of the hemodialysis membrane. W: Principles and practice of dialysis. (3-rd ed.) Lippincot Williams and Wilkins. A Walter Kluwer Co. Philadelphia, 2004,1.
2. Amato M., Cozzolino F., Bergesio F. i wsp.: In vitro interleukin-1 production by different dialysis membranes. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1988, 3, 432.
3. Amore A., Coppo R.: Immunological basis of inflammation in dialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002, 17 (Suppl. 8), 16.
4. Aucella F., Tetta C., Tessore V. i wsp.: Is steam sterilization really making any difference in the dialysis – induced cytokine release? Results with biocompatible synthetically modified cellulose (SCM). *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 223.
5. Aucella F., Vigilante M., Gatta G. i wsp.: Effects of ethylene oxide and steam sterilization on dialysis - induced cytokine release by cuprophane membrane. *Artif. Organs* 2002, 26, 543.
6. Aucella F., Vigilante M., Grandone E. i wsp.: Reduction of mononuclear cytokine production in hemodialysis patients treated with steam - sterilized low-flux polysulphone membranes. *Int. J. Artif. Organs* 1998, 21, 210.
7. Arora P., Strauss B., Borovnicar D. i wsp.: Total body nitrogen predicts long - term mortality in haemodialysis patients - a single-centre experience. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 1731.
8. Baigent C., Burbury K., Wheeler D.: Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet* 2000, 356, 147.
9. Biosource International: Interleukin 6 IRMA (IL-6). Diagnostic catalog 2002 – 2003, 98.
10. Biosource International: Tumor Necrosis Factor- α CB ELISA (TNF – α CB). Diagnostic catalog 2002 – 2003, 104.
11. Blankestijn P.J., Vos P.F., Rabelink T.J. i wsp.: High-flux dialysis membranes improve lipid profile in chronic hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1995, 5, 1703.
12. Bleyer A.J., Russel G.B., Satko S.G.: Sudden and cardiac death rates in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1999, 5, 1553.
13. Bloembergen W.E., Hakim R.M., Stannard D.C. i wsp.: Relationship of dialysis membrane and cause-specific mortality. *Am. J. Kidney Dis.* 1999, 33, 1.
14. Bloembergen W.E., Stannard D.C., Port F.K. i wsp.: Relationship of dose of hemodialysis and cause – specific mortality. *Kidney Int.* 1996, 50, 557.
15. Bologa R.M., Levine D.M., Parker T.S. i wsp.: Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, 32, 107.

16. Bolton C.H., Downs L.G., Victory J.G. i wsp.: Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2001, 16, 1189.
17. Boure T., Vanholder R.: Which membrane to choose? *Nephrol. Dial. Transplant.* 2004, 19, 293.
18. Bowry S.K.: Dialysis membranes today. *Int. J. Artif. Org.* 2002, 5, 447.
19. Bowry S.K. Nano-controlled membrane spinning technology: regulation of pore size, distribution and morphology of a new polysulfone dialysis membrane. *Hemodialysis technology. Contrib. Nephrol.* 2002, 137, 85.
20. Bowry S.K., Ronco C.: Surface topography and surface elemental composition analysis of Helixone®, a new high – flux polysulfone dialysis membrane. *Int. J. Artif. Org.* 2001, 24, 757.
21. Caglar K., Peng Y., Pupim L.B.: Inflammatory signals associated with hemodialysis. *Kidney Int.* 2002, 62, 1408.
22. Canivet E., Lavaud S., Wong T. i wsp.: Cuprophane but not synthetic membrane induces increases in serum tumor necrosis factor-alpha levels during hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis.* 1994, 23, 41.
23. Cavaillon J.M., Poignet J.L., Fitting C. Delons S.: Serum interleukin 6 in long term hemodialysed patients. *Nephron* 1992, 60, 307.
24. Chauveau P., Nguyen H., Combe C. i wsp.: French Study Group for Nutrition in Dialysis: Dialyzer membrane permeability and survival in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Int.* 2005, 45, 3, 565.
25. Cheung A.K., Agodoa L.Y., Daugirdas J.T.: Effects of hemodialyzer reuse on clearances of urea and b2-microglobulin. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999, 10, 117.
26. Chollet – Martin S., Stamatkakis G., Bailly S i wsp.: Induction of tumour necrosis factor – alpha during haemodialysis. Influence of the membrane type. *Clin. Exp. Immunol.* 1991, 83, 329.
27. Clark W.R.: Quantitative characterization of hemodialyzer solute and water transport. *Semin. Dial.* 2001, 14, 32.
28. Clark W.R., Gao D.: Properties of membranes used for hemodialysis therapy. *Semin. Dial.* 2002, 15, 191.
29. Clark W.R., Hamburger R.J., Lysaght M.J.: Effect of membrane composition and structure on solute removal and biocompatibility in hemodialysis. *Kidney Int.* 1999, 56, 2005.

30. Clark W.R., Scott M.K., Leypold J.K.: Reuse of hemodialyzers. Methods and complications of dialyzer reuse. W: Nissenson A. R., Fine R. N. (ed): Dialysis Therapy. Hanley and Belfus Inc. Philadelphia. 2002, 199.
31. Collins A.J., Ma J.Z., Constantini E.G., Everson S.E.: Dialysis unit and patient characteristics associated with reuse practices and mortality: 1989 – 1993. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1998, 9, 2108.
32. Coury J.E., Anderson J. R., McFail-Isom L. i wsp.: Scanning force microscopy of small ligand-nucleic acid complexes: tris(phenanthroline) ruthenium as a test for a new assay. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 3792.
33. Coury J.E., McFail-Isom L., Presnell S. i wsp.: Scanning probe visualization of electrostatically immobilized intercalating drug-nucleic acid complexes. *J. Vac. Sci. Technol.* 1995, 13, 1746.
34. Coyne D.W., Dagogo-Jack S., Klein S. i wsp.: High-flux dialysis lowers plasma leptin concentration in chronic dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, 32, 1031.
35. Cross A. S.: Endotoxin tolerance – current concepts in historical perspective. *J. Endotoxin Res.* 2002, 8, 83.
36. Daichou Y., Kurashige S., Hashimoto S. i wsp.: Characteristic cytokine products of Th1 and Th2 cells in hemodialysis patients. *Nephron* 1999, 83, 237.
37. Descamps-Latscha B., Herbelin A., Nguyen A.T. i wsp.: Balance between IL-1 β , TNF- α , and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis. Relationships with activation markers of T cells, B cells, and monocytes. *J. Immunol.* 1995, 154, 882.
38. Deziel C., Hirsch D.J, Hoult P. i wsp.: Clinical practice guidelines for the delivery of hemodialysis. Canadian Society of Nephrology. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999, 10 (Suppl. 13), S306.
39. Dinarello C. A.: Cytokines as endogenous pyrogens. *J. Infect. Dis.* 1999, 179 (Suppl. 2), S294.
40. Dualcount solid phase no boil assay for vitamin B12 / folic acid. Diagnostic Products Corporation. Los Angeles, CA. December 1995.
41. Drożdż M., Sułowicz W., Kraśniak M.: The influence of dialyzer reuse and heparinisation method on urea kinetic modelling and urea removal. *Int. J. Artif. Organs* 1999, 22, 290.
42. Drożdż M, Gellert R., Sułowicz W i wsp.: Reutilizacja dializatorów. W: Dializoterapia w praktyce lekarskiej. (red.) Rutkowski B. MakMed. 2004.
43. Eknoyan G., Beck G.J., Cheung A.K. i wsp.: Effect of dialysis dose and membrane flux in maintenance hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* 2002, 347, 2010.

44. Espinoza M., Aguilera A., Auxiliarda B.M. i wsp.: Tumor necrosis factor alpha as ureamic toxin: correlation with neuropathy, left ventricular hypertrophy, anemia and hypertriglyceridemia in peritoneal patients. *Adv. Perit. Dial.* 1999, 15, 82.
45. Fagugli R.M., De Smet R. i wsp.: Behavior of non-protein-bound and protein-bound uremic solutes during daily hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis.* 2002, 40, 339.
46. Fagugli R.M., Vanholder R., De Smet R. i wsp.: Advanced glycation end products: specific fluorescence changes of pentosidine-like compounds during short daily hemodialysis. *Int. J. Artif. Organs* 2001, 24, 256.
47. Feldman H.I., Bilker W.B., Hackett M.H. i wsp.: Association of dialyzer reuse with hospitalization and survival rates among US hemodialysis patients: Do comorbidities matter? *J. Clin. Epidemiol.* 1999, 52, 209.
48. Feldman H.I., Bilker W.B., Hackett M., Simmons C.W.: Association of dialyzer reuse and hospitalization rates among hemodialysis patients in the US. *Am. J. Nephrol.* 1999, 19, 641.
49. Feldman H.I., Kinoshian M., Bilker W. i wsp.: Effect of dialyzer reuse on survival of patients treated with hemodialysis. *JAMA* 1996, 276, 620.
50. Foley R.N., Parfrey P.S., Sarnak M.J.: Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, 32 (Suppl. 3), S112.
51. Fresenius Medical Care. ESRD patients in 2003. A Global perspective. Bad Hamburg. 2004.
52. Gagnon R.F., Kaye M.: Dialyzer performance over prolonged reuse. *Clin. Nephrol.* 1985, 25, 21.
53. Garred L.J., Canaud B., Flavier J. L. i wsp.: Effect of reuse on dialyzer efficacy. *Artif. Organs.* 1990, 14, 80.
54. Gesualdo L., Pertosa G., Grandaliano G., Schena F.P.: Cytokines and bioincompatibility. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 1622.
55. McGettrick A., O'Neill L.: The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Molec. Immunol.* 2004, 41, 577.
56. Gomółka M., Niemczyk S., Pączek L.: Cytokiny: mechanizmy prowadzące do zwiększenia produkcji cytokin u chorych hemodializowanych. *Nefrol. Dial. Pol.* 2003, 7, 114.
57. Gomółka M., Niemczyk S., Pączek L.: Kliniczne następstwa zwiększonej produkcji cytokin u chorych przewlekle hemodializowanych. *Nefrol. Dial. Pol.* 2003, 7, 118.
58. Gulyassay P.: Can dialysis remove protein – bound toxins that accumulate due to renal secretory failure? *ASAIO J.* 1994, 40, 92.
59. Gutierrez A., Alvestrand A., Wahren J., Bergstrom J.: Effect of in vivo contact between blood and dialysis membranes on protein catabolism in humans. *Kidney Int.* 1990, 38, 487.

60. Guth H., Gruska S., Kraatz G.: The measurement of cytokine production capacity during dialysis – a new dynamic method for the evaluation of biocompatibility? *Int. J. Artif. Org.* 2000, 23, 675.
61. Hakim R. M.: *Biocompatibility of Dialysis Membranes*. W: Nissensson A.R., Fine R.N.: *Dialysis Therapy*. Hanley and Belfus Inc. Philadelphia. 2002, 110.
62. Hakim R.M.: Clinical implications of hemodialysis biocompatibility. *Kidney Int.* 1993, 44, 484.
63. Hakim R. M.: Influence of the dialysis membrane on outcome of ESRD patients. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, 32, (Suppl. 4), S71.
64. Hakim R.M., Held P.J., Stannard D.C i wsp.: Effect of the dialysis membrane on mortality of chronic hemodialysis patients (CHD) in the US. *Kidney Int.* 1996, 50, 566.
65. Hartmann J., Fricke H., Schiffel H.: Biocompatible membranes preserve residual renal function in patients undergoing regular hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis.* 1997, 30, 366.
66. Held P.J., Port F.K., Webb R.L. i wsp.: Excerpts from the United States Renal Data System 1996 Annual Report. *Am. J. Kidney Dis.* 1996, 28, S79.
67. Held P.J., Port F.K, Wolfe R.A. i wsp.: The dose of hemodialysis and patients mortality. *Kidney Int.* 1996, 50, 550.
68. Held P.J., Wolfe R.A., Gaylin D.S.: Analysis of the association of dialyzer reuse practices and patient outcomes. *Am. J. Kidney Dis.* 1994, 23, 692.
69. Henderson L.W., Clark W.R., Cheung A.K.: Quantification of middle molecular solute removal in dialysis. *Semin. Dial.* 2001, 14, 294.
70. Herbelin A., Urena P., Nguyen A.T. i wsp.: Elevated circulating levels of interleukin 6 in patients with chronic renal failure. *Kiedny Int.* 1991, 39, 954.
71. Hoenich N.A.: Membranes for the treatment of end stage renal disease – current opinions. *Dial. Times* 2001, 7, 5.
72. Hoffmann U., Fischereder M., Marx M. i wsp.: Induction of cytokines and adhesion molecules in stable hemodialysis patients: Is there an effect of membrane material? *Am. J. Nephrol.* 2003, 23, 442.
73. Hornberger J.C., Chernew M., Petersen J., Garber A.M.: A multivariate analysis of mortality and hospital admissions with high-flux dialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1992, 3, 1227.
74. Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., i wsp.: Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J. Immunol.* 1999, 162, 3749.
75. Hörl W.H.: Uremic toxins: New aspects. *J. Nephrol.* 2000, 13, (Suppl. 3), S83.

76. Ifudu O., Feldman J., Friedman E.A. i wsp. The intensity of hemodialysis and the response to erythropoietin in patients with endstage renal disease. *N. Engl. J. Med.* 1996, 334, 420.
77. Ikizler T.A., Flakoll P.J., Parker R.A. i wsp.: Amino acid and albumin losses during hemodialysis. *Kidney Int.* 1994, 46, 830.
78. Ikizler T.A., Wingard R.L., Harvell J. i wsp.: Association of morbidity with markers of nutrition and inflammation in chronic hemodialysis patients: A prospective study. *Kidny Int.* 1999, 55, 1945.
79. Ing T.S., Cheung A.K., Golper T.A. i wsp.: Task force on reuse of dialyzers: National Kidney Foundation Report on Dialyzer Reuse. *Am. J. Kidney Dis.* 1997, 30, 859.
80. Ivanovich P., Rosner K.: A case for cellulosic membrane hemodialyzers. *Semin. Dial.* 2000, 13, 409.
81. Jadoul M., Ueda Y., Yasuda Y. i wsp.: Influence of hemodialysis membrane type on pentosidine plasma level, a marker of "carbonyl stress". *Kidney Int.* 1999, 55, 2487.
82. Kaizu Y., Kimura M., Yoneyama T. i wsp.: Interleukin-6 may mediate malnutrition in chronic hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, 31, 93.
83. Kalantar - Zadeh K., Ikizler T., Block G. i wsp.: Malnutrition-inflammation complex syndrome in dialysis patients: Causes and consequences. *Am. J. Kidney Dis.* 2003, 42, 864.
84. Kaplan A.A.: Dialyzer reuse: What we know and what we don't know. *Semin. Dial.* 2000, 13, 271.
85. Kaul H., Girndt M., Sester U. i wsp.: Initiation of hemodialysis treatment leads to improvement of T-cell activation in patients with end-stage renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 2000, 35, 611.
86. Kaye M., Gagnon R., Mulhearn B., Spergel D.: Prolonged dialyzer reuse. *Artif. Organs* 1984, 30, 491.
87. Kessler M., Canaud B., Pedrini L.A. i wsp.: European Best Practice Guidelines for Haemodialysis. Section II. Hemodialysis adequacy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002, 17 (Suppl. 7), S16.
88. Kimmel P.L., Mishkin G.J.: Dialyzer reuse and the treatment of patients with end-stage renal disease by hemodialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1998, 9, 2153.
89. Kimmel P.L., Phillips T.M., Simmens S.J. i wsp.: Immunologic function and survival in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1998, 54, 236.
90. Kino K., Akizawa T., Koshikawa S.: Effects of membrane characteristics on cytokine production by mononuclear cells in regular haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1995, 10 (Suppl. 3), 29.

91. Klinkmann H., Grassmann A., Vienken J.: Dilemma of membrane biocompatibility and reuse. *Artif. Organs.* 1996, 20, 426.
92. Koda Y., Nishi S., Miyzaki S. i wsp.: Switch from conventional to high – flux membrane reduces the risk of carpal tunnel syndrome and mortality of hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1997, 52, 1096.
93. Kopp E., Medzhitov R.: Recognition of microbial infection by Toll – like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 2003, 15, 396.
94. Lee J. A., Lee H. A., Sadler P.J.: Uraemia: Is urea more important than we think? *Lancet.* 1991, 338, 1438.
95. Lesaffer G., De Smet R., Lameire N. i wsp.: Intradialytic removal of protein – bound ureamic toxins: Role of solute characteristics and of dialyser membrane. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 50.
96. Levin N.W.: Does reuse have clinically important effects on dialyzer function? *Semin. Dial.* 2000, 13, 286.
97. Leypoldt J. K.: Does reuse have clinically important effects on dialyzer function? *Semin. Dial.* 2000, 13, 281.
98. Leypoldt J.K.: Fouling of ultrafiltration and hemodialysis membranes by plasma proteins. *Blood Purif.* 1994, 12, 285.
99. Leypoldt J.K., Cheung A.K., Carroll C.E. i wsp.: Effect of dialysis membranes and middle molecule removal on chronic hemodialysis patient survival. *Am. J. Kidney Dis.* 1999, 33, 349.
100. Leypoldt J.K., Cheung A.K., Clark W.R. i wsp.: Hemodialysis (HEMO) Study, NIDDK, NIH: Characterization of low and high - flux dialysers with reuse in the HEMO Study: Interim report. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1996, 7, 1518.
101. Leypoldt J.K., Cheung A.K., Deeter R.B.: Effect of hemodialyzer reuse: dissociation between clearances of small and large solutes. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, 32, 295.
102. Li M., Carpio D.F., Zheng Y. i wsp.: An essential role of the NF-kappa B/ Toll –like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue – repair gene expression by necrotic cells. *J. Immunol.* 2001, 166, 7128.
103. Li Q., Verma I.M.: NF – kappa B regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2002, 2, 725.
104. Light P. D.: Reuse of hemodialysis membranes in chronic dialysis therapy. *Principles and Practice of Dialysis.* Lippincot Williams & Wilkins. 2003.
105. Liu X., Sugiyama S., Xu Q. i wsp.: Atomic force microscopy study of chromosome surface changed by protein extraction. *Ultramicroscopy* 2003, 94, 217.

106. Locatelli F., Marcelli D., Conte F. i wsp.: Comparison of mortality in ESRD patients on convective and diffusive extracorporeal treatments. The Registro Lombardo Dialisi E Trapianto. *Kidney Int.* 1999, 55, 286.
107. Locatelli F., Mastrangelo F., Redaelli B. i wsp.: Effects of different membranes and dialysis technologies on patient treatment tolerance and nutritional parameters. The Italian Cooperative Dialysis Study Group. *Kidney Int.* 1996, 50, 1293.
108. Lonnemann G., Koch K.M., Shaldon S., Dinarello C.A.: Studies on the ability of hemodialysis membranes to induce, bind and clear human interleukin-1. *J. Lab. Clin. Med.* 1988, 112, 76.
109. Luciak M., Zbróg Z.: Niektóre problemy biogodności w dializoterapii. W: *Dializoterapia w praktyce lekarskiej.* (red.) Rutkowski B. MakMedia. Gdańsk. 2004, 217.
110. Matsuda T.: Biological response at non-physiological interfaces and molecular design of biocompatible surfaces. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1989, 4, 60.
111. Medzhitov R.: Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews. Immunology.* 2001, 1, 135.
112. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997, 388, 394.
113. Memoli B.: Cytokine production in hemodialysis. *Blood Purif.* 1999, 17, 149.
114. Memoli B., Postiglione L., Cianciaruso B. i wsp.: Role of different dialysis membranes in the release of interleukin-6 soluble receptor in uremic patients. *Kidney Int.* 2000, 58, 417.
115. Mishkin G.J.: What clinically important advances in understanding and improving dialyzer function have occurred recently? *Semin. Dial.* 2001, 14, 170.
116. Murthy B.V.R., Pereira B.J.G.: Does reuse have clinically important effects on dialyzer function? *Semin. Dial.* 2000, 13, 282.
117. Nakahama H., Tanaka Y., Shirai D. i wsp.: Plasma interleukin 6 levels in continuous ambulatory peritoneal dialysis and hemodialysis patients. *Nephron* 1992, 61, 132.
118. Nathan C.F.: Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 1987, 79, 319.
119. National Kidney Foundation: Revised standards for reuse of hemodialyzers. *Am. J. Kidney Dis.* 1984, 3, 466.
120. Navarro J.F., Marcen R., Teruel J.L. i wsp.: Effect of different membranes on amino-acid losses during haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 113.
121. O'Neil L. A.: SIGIRR puts the brakes on Toll – like receptors. *Nat. Immunol.* 2003, 4, 823.

122. NKF – DOQI clinical practice guidelines for hemodialysis adequacy. National Kidney Foundation. *Am. J. Kidney Dis.* 1997, 30, S15.
123. NKF – DOQI clinical practice guidelines for hemodialysis adequacy: update 2000. *Am. J. Kidney Dis.* 2001, 37, S7.
124. Noronha I.L., Fujihara C.K., Zatz R.: The inflammatory component in progressive renal disease - are interventions possible? *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002, 17, 363.
125. Nowak S., Pietrzyk J.A., Sułowicz W. i wsp.: Optymalizacja reutilizacji dializatorów. Sprawozdanie projektu badawczego: KBN nr 8T11E 037 12. Kraków 1999.
126. Ogden D.A.: Dialyser reuse. W: Nissenson A.R., Fine R.N., Gentile D.E. (red.). *Clinical dialysis*. 2-nd ed. Appelton & Lange, Norwalk, CT, 1990, 202.
127. Okano T., Aoyagi T., Kataoka K. i wsp.: The hydrophilic – hydrophobic microdomain surface having the ability to suppress platelet adhesion and their in-vivo anti-trombogenicity. *J. Biomed. Mater. Res.* 1986, 20, 919.
128. Ouseph R., Smith B.P., Ward R.A.: Maintaining blood compartment volume in dialyzers reprocessed with peracetic acid maintains Kt/V but not beta2-microglobulin removal. *Am. J. Kidney Dis.* 1997, 30, 501.
129. Owen W.F., Lew N.L., Liu Y. i wsp.: The urea reuction ratio and serum albumin concentration as predictors of mortality in patients undergoing hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* 1993, 329, 1001.
130. Panichi V., Migliori M., DePietro S. i wsp.: The link of biocompatibility to cytokine production. *Kidney Int.* 2000 (Suppl. 76), 58, S96.
131. Parker T.F., Wingard R.L., Husni L. i wsp.: Effect of membrane biocompatibility on nutritional parameters in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1996, 49, 551.
132. Pecoits-Filho R., Barany P., Lindholm B. i wsp.: Interleukin-6 is an independent predictor of mortality in patients starting dialysis treatment. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002, 17, 1684.
133. Pecoits-Filho R., Lindholm B., Axelsson J., Stenvinkel P.: Update on interleukin-6 and its role in chronic renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003, 18, 1042.
134. Peterson J., Jani A.: Does reuse have clinically important effects on dialyzer function? *Semin. Dial.* 2000, 13, 289.
135. Pertosa G., Grandaliano G., Gesualdo L., Schena F. P.: Clinical relevance of cytokine production in hemodialysis. *Kidney Int.* 2000, 58 (Suppl. 76), S104.
136. Pietrzyk J.A.: Wskaźniki skuteczności i metody monitorowania adekwatności leczenia hemodializą. W: *Dializoterapia w praktyce lekarskiej*. (red.) Rutkowski B. Makmedia. 2004, 152.

137. Pietrzyk J.A., Zachwieja K.: Hemodializa u dzieci. W: Nefrologia dziecięca. (red.) Sieniawska M., Wyszyńska T. Tom 3, Warszawa 2004, 237.
138. Poltorak A., He X., Smirnova I. i wsp.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. *Science* 1998, 282, 2085.
139. Pope L. H., Davies M.C., Laughton C.A. i wsp.: Atomic force microscopy studies. *J. Microscopy* 2000, 199, 68.
140. Port F.K., Wolfe R.A., Hulbert-Shearon T.E.: Mortality risk by hemodialyzer reuse practice and dialyzer membrane characteristics: Results from the USRDS dialysis morbidity and mortality study. *Am. J. Kidney Dis.* 2001, 37, 276.
141. Puka J., Rutkowski B., Liberek T. i wsp.: Raport o stanie leczenia nerkozastępczego w Polsce 1999. *Kraj. Kon. Med. w Dziedz. Nefrol.* Gdańsk 2000.
142. Puka J., Rutkowski B., Lichodziejewska – Niemirko M. i wsp.: Raport o stanie leczenia nerkozastępczego w Polsce – 2003. MAKmedia. Gdańsk. 2004.
143. Qian J., Yu Z., Dai H. i wsp.: The study of IL-1 β , TNF- α , IL-6 gene expression and plasma levels on haemodialysis before and after dialyzer reuse. *J. Chin. Med.* 1997, 110, 508.
144. Quist A.P., Bergman A.A., Reimann C.T. i wsp.: Imaging of single antigens antibodies, and specific immunocomplex formation by Scanning Force Microscopy. *Scanning Microscopy* 1995, 9, 395.
145. Qureshi, S. T. Larivière L., Leveque G. i wsp.: Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (TLR4). *J. Exp. Med.* 1999, 189, 615.
146. Raj D., Shah H., Shah V. i wsp.: Markers of inflammation. Proteolysis and apoptosis in ESRD. *Am. J. Kidney Dis.* 2003, 42, 1212.
147. Rault R.M.: Effects of dialyzer membrane on serum albumin levels in patients receiving hemodialysis. *Int. J. Artif. Org.* 2003, 25, 1002.
148. Renal Systems Inc.: Renalin. Dialyzer reprocessing concentrate. Instruction for use and technical notes. Minneapolis 1983.
149. Renal Systems Inc.: Renatron. Dialyzer reprocessing system. Model RS 8300. Instruction Manual. Minneapolis 1983.
150. Roccatello D., Formica M., Cavalli G. i wsp.: Serum and intracellular detection of cytokines in patients undergoing chronic haemodialysis. *Artif. Organs* 1992, 16, 2, 131.
151. Ronco C.: What clinically important advances in understanding and improving dialyzer function have occurred recently? *Semin. Dial.* 2001, 14, 164.
152. Ronco C., Bowry S.: Nanoscale modulation of the pore dimensions, size distributions and structure of a new polysulfone-based high-flux dialysis membrane. *Int. J. Artif. Organs.* 2001, 24, 726.

153. Ronco C., LaGreca G.: Membranes for dialysis. Composition, structure and function. *Hemodialysis Technology. Contrib. Nephrol.* 2002, 137, 70.
154. Ronco C., Nissenson A.R.: Does nanotechnology apply to dialysis? *Blood Purif.* 2001, 19, 347.
155. Ronco C., Nissenson A. R.: Nanotechnology and dialysis. *Int. J. Artif. Org.* 2004, 27, 3.
156. Rostaing L., Peres C., Tkaczuk J. i wsp.: Ex vivo flow cytometry determination of intracytoplasmic expression of IL-2, IL-6, IFN-gamma, and TNF-alpha in monocytes and T lymphocytes, in chronic hemodialysis patients. *Am. J. Nephrol.* 2000, 20, 18.
157. Rumian R., Krawentek L., Pietrzyk J.A.: Zastosowanie techniki atomowego mikroskopu siłowego (AFM) do badań nad strukturą i biogodnością błon dializacyjnych. Sprawozdanie z realizacji projektu badawczego KBN nr 4T11E 024 22. Kraków 2004.
158. Rutkowski B.: Dializoterapia w XXI wieku. *Postępy Nauk Medycznych, Tom XVI. Borgis.* 2003, 1-2.
159. Rutkowski B., Rutkowski P.: Toksyne mocznicowe – stare i nowe. W: *Postępy w nefrologii i nadciśnieniu tętniczym, Tom III. Więcek A. (red.) Kokot F. Medycyna Praktyczna,* 2004.
160. Sander J.H. van Deventer, Buller H.R., Cate J. W. i wsp.: Experimental endotoxemia in humans: Analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic and complement pathways. *Blood* 1990, 76, 12, 2520.
161. Schiff H., Lang S.M., Stratakis D., Fisher R.: Effects of ultrapure dialysis fluid on nutritional status and inflammatory parameters. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2001, 16, 1863.
162. Schilling D., Thomas K., Nixdorff K. i wsp.: Toll-Like Receptor 4 and Toll-IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter Protein (TIRAP) / Myeloid Differentiation Protein 88 Adapter-Like (Mal) Contribute to Maximal IL-6 Expression in Macrophages. *J. Immunol.* 2002, 169, 5874.
163. Schouten W., Grooteman M., Houte A. i wsp.: Effects of dialyser and dialysate on the acute phase reaction in clinical bicarbonate dialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 379.
164. Serry F. M., Revenko I., Allen M. J.: Applications of atomic force microscopy for contact lens manufacturing. *Digital Instruments. Santa Barbara, CA.* 1998.
165. Shikano M., Sobajima H., Yoshikawa H. i wsp.: Usefulness of highly sensitive urinary and serum IL-6 assay in patients with diabetic nephropathy. *Nephron* 2000, 85, 81.
166. Shinzato T., Nakai S., Akiba T. i wsp.: Survival in long term haemodialysis patients: results from the annual survey of the Japanese Society for Dialysis Therapy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997, 12, 884.

167. Siedlar M., Szaflarska A., Szczepanik A. i wsp.: Depressed tumor necrosis factor alpha and interleukin-12p40 production by peripheral blood mononuclear cells of gastric cancer patients: Association with IL-1R-associated kinase-1 protein expression and disease stage. *Int. J. Cancer* 2005, 114, 144.
168. DeSmet R., van Kaer J., van Vlem B. i wsp.: A decrease of serum albumin increases the free concentration of p-cresol and its toxicity. *Int. J. Artif. Org.* 2001, 24, 544.
169. Stenvinkel P., Alvestrand A.: Inflammation in endstage renal disease: Sources, consequences, and therapy. *Semin. Dial.* 2002, 15, 329.
170. Stenvinkel P., Barany P., Heimbürger O. i wsp.: Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: What is the role of interleukin-6? *Kidney Int.* 2002, 61 (Suppl. 80), 103.
171. Stompór T., Sułowicz W.: Zespół Malnutrition – Inflammation – Atherosclerosis – istotna przyczyna zwiększonej chorobowości i śmiertelności pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek. *Nefrol. Dial. Pol.* 2002, 6, 65.
172. Sztefko K.: Wykłady monograficzne z diagnostyki laboratoryjnej, cz. I., wyd. UJ, Kraków 2002.
173. Takeda K., Kaisho T., Akira S.: Toll – like receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 2003, 21, 335.
174. Task Force on Reuse of Dialyzers. Council on Dialysis. National Kidney Foundation. National Kidney Foundation report on dialyzer reuse. *Am. J. Kidney Dis.* 1997, 30, 859.
175. Targosz M., Szymoński M., Mikłaszewska M. i wsp.: Nowe techniki pomiarowe w biologii i medycynie: mikroskopia sił atomowych (cz. I). *Przegląd Lekarski.* 2003, 60, 828.
176. Tattersall J.E., Cramp M., Shannon M. i wsp.: Rapid high-flux dialysis can cure uraemic peripheral neuropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1992, 7, 539.
177. Termeer C., Benedix F., Sleeman J. i wsp.: Oligosacharydes of hyaluronian activate dendric cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 2002, 195, 99.
178. Tkaczyk M., Jander A., Baj Z., Nowicki M.: Wpływ reutilizacji dializatora na czynność płytek krwi u hemodializowanych dzieci. *Probl. Lek.* 2004, 2 (Suppl.), 33.
179. Tsunoda N., Kokubo K., Sakai K. i wsp.: Surface roughness of cellulose hollow fiber dialysis membranes and platelet adhesion. *ASAIO* 1999, 45, 418.
180. US Renal Data System: Survival, moratlity and causes of death. *Am. J. Kidney Dis.* 2000, 36, S127.
181. Vanholder R.C.: Clical implications of uremic toxins. *Membrane Letter.* 2004, 1.
182. Vanholder R.C.: An Overview of Uremic Toxicity. *Hemodial. Int.* 2003, 7, 156.

183. Vanholder R.C.: Uremic toxins: removal with different therapies. *Hemodial. Int.* 2003, 7, 162.
184. Vanholder R., Argiles A., Baurmeister U. i wsp.: Uremic toxicity: present state of art. *Int. J. Artif. Organs* 2001, 24, 695.
185. Vanholder R., Ringoir S.M.: Adequacy of dialysis: A critical analysis. *Kidney Int.* 1992, 42, 540.
186. Vanholder R., De Smet R.: Pathophysiologic effects of uremic retention solutes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999, 10, 1815.
187. Vanholder R.C., De Smet R., Glorieux G. i wsp.: Review on uremic toxins: classification, concentration and interindividual variability. *Kidney Int.* 2003, 63, 1934.
188. Vanholder R.C., De Smet R., Glorieux G., Dhondt A.: Survival of hemodialysis patients and uremic toxin removal. *Artif. Organs* 2003, 27, 218.
189. Vanholder R.C, De Smet R., Hsu C. i wsp.: Uremic toxicity: the middle molecule hypothesis revisited. *Semin. Nephrol.* 1994, 14, 205.
190. Vanholder R.C., De Smet R., Lesaffer G.: Dissociation between dialysis adequacy and Kt/V. *Semin Dial.* 2002, 15, 3.
191. Vanholder R.C, De Smet R., Ringoir S.M.: Assesment of urea and other uremic markers for quantification of dialysis efficacy. *Clin. Chem.* 1992, 38, 1429.
192. Varela M.P., Kimmel P.L., Phillips T.M. i wsp.: Biocompatibility of hemodialysis membranes: Interrelations between plasma complement and cytokine levels. *Blood Purif.* 2001,19, 370.
193. Vienken J., Diamontoglou M., Hahn C. i wsp.: Considerations on developmental aspects of biocompatible membranes. *Artif. Organs* 1995, 19, 398.
194. Vlcheck D.L.: The economics of dialyzer reuse in AAMI standards and recommended practices. *Association for the Advancement of Medical Instrumentation.* 1995, 3, 369.
195. Walton D.F., Cheung A.K.: Membrane biocompatibility. W: Nissenson A.R., Fine A.N., Gentile D.E.: *Clinical Dialysis* (ed. 3). Norwalk. CT. Appleton & Lange. 1995, 93.
196. Widjaja A., Kielstein J.T., Horn R. i wsp.: Free serum leptin but not bound leptin concentrations are elevated in patients with end-stage renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 846.
197. Wiesholzer M., Harm F., Hauser A.C. i wsp.: Inappropriately high plasma leptin levels in obese haemodialysis patients can be reduced by high flux haemodialysis and haemodiafiltration. *Clin. Sci.* 1998; 94, 431.
198. Wizemann V., Kulz M., Techert F., Nederlof B.: Efficacy of heamodiafiltration. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2001, 16 (Suppl. 4), 27.

199. Wolfson M., Jones M.R., Kopple J.D.: Amino acid losses during hemodialysis with infusion of amino acids and glucose. *Kidney Int.* 1982, 21, 500.
200. Yan H., Zhang Z., Li M. i wsp.: Hemodialysis-related induction of interleukin-6 and interleukin-8 production by peripheral blood mononuclear cells. *Hong Kong J. Neph.* 2001, 3, 33.
201. Yavuz A., Tetta C., Ersoy F. i wsp.: Uremic Toxins: A new focus on an old subject. *Semin. Dial.* 2005, 18, 203.
202. Zager P., Campbell M., Huni C., Brown R.: Effect of dialyzer reprocessing on standardized mortality ratios within a large not-for-profit chain. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1994, 5, 485.
203. Zdrojewski Z.: Techniki stosowane w hemodializie. W: *Dializoterapia w praktyce lekarskiej.* (red.) Rutkowski B. Makmed. 2004, 105.
204. Ziegler – Heitbrock L.: The p50 – homodimer mechanizm in tolerance to LPS. *J. Endotoxin Res.* 2001, 7, 219.
205. Ziółko M., Pietrzyk J.A., Dyras P. i wsp.: *Optymalizacja dializy krótkotrwałej. Sprawozdanie projektu badawczego nr KBN 3P401 02105.* Kraków 1995.
206. Ziółko M., Pietrzyk J.A., Grabska - Chrzastowska J.: Accuracy of hemodialysis modelling. *Kidney Int.* 2000, 57, 1152.
207. Ziółko M., Pietrzyk J.A., Komorowska M.: Kinetyczne modele dializoterapii. *Nefrol. Dial. Pol.* 1997, 1, 145.

8. STRESZCZENIE

Szorstkość i nanostruktura powierzchni, skład chemiczny oraz współczynniki przepuszczalności masowej (K_{oA}) i ultrafiltracji (K_{ufr}) błony dializacyjnej są głównymi determinantami biozgodności oraz charakterystyki czynnościowej dializatora. Biofilm wytworzony w czasie sesji hemodializy (HD) na powierzchni błony dializacyjnej niecałkowicie usuwany przez środki powszechnie stosowane w procesie reutilizacji dializatorów - w trakcie kolejnych zabiegów HD ogranicza głównie dyfuzję związków o większej masie cząsteczkowej. W przypadku błon o niskich wartościach K_{oA} i K_{ufr} to ograniczenie dyfuzji dotyczy już cząsteczek o masie cząsteczkowej od około 0,5 kDa. Kumulacji związków średnio- i wielkocząsteczkowych towarzyszy pobudzenie układu immunologicznego chorego, głównie pod postacią pobudzenia komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMK) i sekrecji licznych cytokin - jako odpowiedź na kontakt z błonami o niskim stopniu biozgodności. Uważa się, że biozgodność jest jednym z czynników decydujących o adekwatności HD.

Celem pracy było: 1. Porównanie struktury w skali nanometrów dwóch najczęściej stosowanych w hemodializoterapii typów błon dializacyjnych wykonanych z kuprofanu (KUP) i polisulfonu (PS) oraz ocena zmian ich nanostruktury w zależności od krotności reutilizacji dializatora; 2. Ocena wpływu krotności reutilizacji na zachowanie się klirensu dializatora KUP i PS, mierzonego wartością klirensu rzeczywistego (K_D) związków niskocząsteczkowych (mocznika, kreatyniny, kwasu moczowego) oraz średnicząsteczkowych (kwasu foliowego); 3. Określenie optymalnej liczby reutilizacji badanych dializatorów; 4. Ocena i porównanie biozgodności błon KUP i PS nowych i poddawanych reutilizacji za pomocą oznaczania IL-6 oraz TNF α ; 5. Korelacja nanostruktury błony dializacyjnej ze stężeniami IL-6 i TNF α .

Pomiarów szorstkości powierzchni wyrażonej jako RMS dokonano techniką mikroskopii sił atomowych (AFM) badając nowe dializatory oraz po kolejnych reutilizacjach kwasem nadoctowym (po 1, 2, 3, 4 i 5 – reutilizacji dla KUP oraz po 1, 3, 5, 7 i 10 – reutilizacji dla PS). Uzyskane wyniki skorelowano z wartościami stężeń IL-6 i TNF α oznaczanych w surowicy chorych w trakcie każdej sesji HD (IL-6 oznaczano w czasie: t_0 i t_{120} ; TNF α : t_0 i t_{90}). Wpływ krotności reutilizacji dializatora na K_D KUP badano dla nowych filtrów i po 1, 2, 3, 4 i 5 - krotnej reutilizacji, natomiast w przypadku PS - dla nowych filtrów i po 1, 3, 5, 7 i 10 - krotnej reutilizacji.

Wyniki: Badania wykonane za pomocą AFM wykazały, że średnia wartość RMS powierzchni wewnętrznej (pow. wewn.) dla PS wynosiła – 8,7 nm; dla KUP – 4,1 nm; średnia wartość współczynnika zmienności (V%) dla RMS pow. wewn. PS wynosiła 37,5%; dla KUP - 53,8%, tempo zmian (T%) dla RMS pow. wewn. PS wynosiło 31,6%; natomiast dla KUP – wartość tego współczynnika wzrosła do 99,8%. Nie odnotowano istotnego statystycznie spadku K_D markerów toksyn niskocząsteczkowych nawet po większej liczbie reutilizacji badanych dializatorów. Obserwowana wartość K_D markera toksyn średnicząsteczkowych istotnie statystycznie zmniejszyła się po 4. (o 32,9%) i 5. (o 45,4%; $p < 0,001$) reutilizacji w przypadku KUP, w przypadku PS - wartości K_D zmniejszyły się istotnie statystycznie po 3. reutilizacji (o 36,1%), przy czym po 11. użyciu PS – jego eliminacja zmniejszyła się o 53,9% ($p < 0,001$) w porównaniu do nowych filtrów. Monitorowany przyrost IL-6 w trakcie dializy na nowym oraz reutilizowanym KUP był znamienny statystycznie ($p < 0,048$) dla każdego użycia dializatora, w przypadku PS - przyrost stężeń IL-6 nie osiągnął znamienności statystycznej w żadnym przypadku użycia dializatora. Analogiczny przyrost TNF α dla KUP i PS - nie osiągnął znamienności statystycznej w żadnej krotności użycia badanych dializatorów.

Na podstawie przeprowadzonych badań i po analizie statystycznej wyników wysunięto następujące wnioski: 1) Szorstkość powierzchni wewnętrznych i zewnętrznych badanych błon (wyrażona jako średnia wartość RMS) uwidacznia asymetryczną nanostrukturę błony PS i symetryczną KUP. Średnie wartości V% dla RMS oraz wskaźniki dynamiki zmian dla RMS zarówno pow. wewn. jak i pow. zewn. badanych błon świadczą o większej jednorodności i stabilności nanostruktury nowej i reutilizowanej błony PS w porównaniu do błony KUP. Reutilizacja dializatorów kwasem nadoctowym nie wpływa w sposób istotny na zmianę nanostruktury powierzchni badanych błon. 2) Klirens markerów toksyn niskocząsteczkowych nie ulega istotnej zmianie po kolejnych reutilizacjach kwasem nadoctowym. 3) Wartości klirensów substancji wzorcowej toksyn średnicząsteczkowych - świadczą, że liczba reutilizacji KUP nie powinna przekraczać 3, natomiast PS – 7. 4) W grupie pacjentów dializowanych przy użyciu nowych i reutilizowanych błon KUP stwierdzono wysoce statystycznie znamienne większe (ok. 19 – krotnie) przyrosty stężenia IL-6 w porównaniu do chorych dializowanych przy użyciu kapilar PS. Analogicznej zależności nie stwierdzono dla TNF α , którego stężenie nie ulegało zmianom w trakcie badania. Reutilizacja badanych dializatorów kwasem nadoctowym nie poprawia stopnia ich biozgodności ocenianej metodą monitorowania stężeń IL-6 i TNF α . 5. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy szorstkością powierzchni badanych błon (wartości RMS) a ich biozgodnością (wartości IL-6 i TNF α), co

zwraca uwagę na znaczenie rodzaju tworzywa z którego wyprodukowana jest błona dializacyjna, jako czynnika decydującego o jej biogodności.

9. ABSTRACT

Internal surface roughness, chemical profile, molecular mass transfer (K_{oA}) and ultrafiltration coefficients (K_{ufr}) of dialysis membrane are the main determinants of biocompatibility and functional profile of each dialyzer. Biofilm formed during hemodialysis session on dialysis membrane's surface, not entirely removed by commonly used reprocessing chemicals, is a major cause of diffusion diminution but mainly of substances of larger molecular weight during consecutive HD sessions. In case of *low – flux* membranes (low values of K_{oA} and K_{ufr}) this diffusion diminution already concerns relatively small molecules with a molecular weight starting from about 0,5 kDa. Middle and large molecule compounds accumulation is accompanied by a patients' immunological system activation which is a response to direct blood contact with dialysis membranes of low grade biocompatibility. The response mainly presents as peripheral blood mononuclear cells (PBMC) activation and secretion of many cytokines. Nowadays, biocompatibility of dialysis membranes is considered to be one of the major and decisive factors determining HD adequacy

The aims of the study were as follows: 1. Comparison of 2 types of dialysis membranes' surface nanostructure in nanometer scale (cuprophane – CUP, polysulfone – PS) and their change assessment depending on the number of dialyser reuses. 2. Assessment of PS and CUP dialysers' peracetic acid reprocessing effect upon small and middle molecule uraemic toxins' actual dialyser clearance (K_D). The markers were as follows: urea, creatinine, uric acid and folic acid, respectively. 3. Evaluation of optimal dialyzer reuse number for studied membranes' types. 4. Assessment and comparison of biocompatibility degree of the studied new and reused dialysis membranes by monitoring IL-6 and $TNF\alpha$ concentrations in patients' serum. 5. Correlation of surface nanostructure of given dialysis membrane with IL-6 and $TNF\alpha$ concentrations.

The dialysis membranes' surface roughness measurements expressed as RMS (*root mean square*) were accomplished with atomic force microscopy (AFM) technique – using new dialyzers and after consecutive (1, 2, 3, 4, 5 – th for CUP and after 1, 3, 5, 7, 10 – th for PS) dialyser use numbers. The collected results were then correlated with the values of IL-6 and $TNF\alpha$ which were determined in patients' serum during each HD session (IL-6 concentrations were determined in t_0 and t_{120} ; $TNF\alpha$: in t_0 and t_{90}). Reprocessing effect on CUP dialysers' performance was evaluated by assessing the actual clearance of a new dialyzer and after its 1, 2, 3, 4 and 5-th reuse number, while reprocessing effect on PS dialysers' performance was

evaluated by assessing the clearance of a new dialyzer and after its 1, 3, 5, 7 and 10-th reuse number.

Results: Measurements accomplished with AFM technique disclosed that the mean RMS value of internal PS surface was 8,7 nm and 4,1 nm of CUP, respectively. Mean value of variable coefficient (V%) for RMS of PS internal surface was 37,5% and of CUP - 53,8%. The “change rate” (T%) for RMS of PS internal surface was 31,6% but had risen significantly to 99,8 % in CUP membranes. No significant falls in small molecules K_D have been found both in PS and CUP dialyzers, even after higher number of dialyser reuse rates. Observed clearance of the middle molecules’ marker decreased significantly after the 4th (by 32,9%) and the 5th (by 45,4%; $p < 0,001$) reuse number of CUP dialyzers, and after the 3rd reuse of PS dialyzers (by 36,1%), however after the 10th PS dialyzers’ reuse number, the middle molecules’ marker clearance decreased by 53,9% ($p < 0,001$) in comparison with new devices. The increase of IL-6 concentrations during HD on new and reused CUP dialyzer was statistically significant ($p < 0,048$) in each HD session; however in case of PS – the analogous increase of IL-6 did not reach the statistical significance in either HD session. The analogous increase of TNF α concentration during HD performed with new and reused CUP and PS dialyzers was statistically significant in neither HD session.

On the basis of conducted studies and after the statistical analysis of obtained results – the following conclusions were drawn: 1. Internal and external surface roughness of studied membranes (expressed as mean RMS value) disclosed asymmetrical nanostructure of PS and symmetrical nanostructure of CUP membrane. Mean values of variable coefficient (V%) for RMS and dynamic changes coefficients for RMS of both internal and external surface of studied dialysis membranes - prove greater nanostructure stability of the new and reused PS membranes in comparison with CUP ones. Reuse of dialysis membranes with peracetic acid does not affect significantly the surface nanostructure of studied dialysis membranes. 2. Small molecules markers’ clearances do not change significantly during succeeding dialyzers’ reuse numbers with peracetic acid. 3. The results of middle molecules’ marker’s clearance disclosed that reprocessing number of CUP dialyzers should not exceed 3, and of PS – 7. 4. In a group of patients dialysed with CUP dialyzers an essentially higher increase (up to about 19 times) of IL-6 concentration was obtained in comparison with patients dialysed with PS ones and this difference has been found highly statistically significant. Analogous correlation was not achieved for TNF α , the concentration of which didn’t change during the whole study. Reuse of studied dialysis membranes with peracetic acid does not improve their biocompatibility degree determined by monitoring IL-6 and TNF α concentrations. 5. No correlation between

the dialysis membranes' surface roughness (RMS) and their biocompatibility degree (IL-6 and TNF α) has been found in this study, which takes note of importance of chemical composition of material the capillaries are made of as a decisive factor determining and influencing dialysers' biocompatibility.