

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Marek Kolarz

**Przeciwciała przeciwko homocysteinyłowanym białkom
u chorych leczonych przewlekle hemodializami**

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Anetta Undas

Pracę wykonano w Zakładzie Kardiochirurgii, Anestezjologii i
Kardiologii Doświadczalnej Instytutu Kardiologii Collegium
Medicum UJ

Kierownik Zakładu prof. dr hab. med. Anetta Undas

Kraków, 2010

Spis treści

1. Spis stosowanych skrótów	3
2. Wstęp	5
2.1. Przewlekła choroba nerek	5
2.2. Choroby sercowo-naczyniowe w przewlekłej chorobie nerek	12
2.3. Homocysteina i jej metabolizm	15
2.4. Hiperhomocysteinemia – definicja i przyczyny	16
2.5. Hiperhomocysteinemia w przewlekłej chorobie nerek	17
2.6. Mechanizmy toksycznego działania homocysteiny	18
3. Założenia i cele pracy	24
4. Badani	25
4.1. Grupa badana	25
4.2. Grupa kontrolna	26
5. Metody	27
5.1. Badanie kliniczne	27
5.2. Badania podstawowe	27
5.3. Badania dodatkowe	27
5.4. Odległa obserwacja kliniczna	30
5.5. Analiza statystyczna	30
6. Wyniki	32
6.1. Wyjściowa charakterystyka obu grup	32
6.2. Poziom homocysteiny całkowitej	34
6.3. Poziom przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-albuminie oraz Nε-Hcy-hemoglobinie	35
6.4. Czynniki wpływające na poziom przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanym białkom	43
6.5. Odległa obserwacja kliniczna	46
7. Omówienie	49
7.1. Poziom przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanym białkom	49
7.2. Zależności pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanym białkom a innymi wynikami badań laboratoryjnych	50
7.3. Zależności pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanym białkom a danymi klinicznymi	53
7.4. Obserwacja kliniczna	54
7.5. Ograniczenia badania	56
8. Wnioski	57
9. Streszczenie	58
10. Summary	61
11. Piśmiennictwo	64

1. Spis stosowanych skrótów

8-izo-PGF _{2α}	8-izoprostaglandyna F _{2α}
ADMA	asymetryczna dimetyloarginina
AGE	produkty końcowe glikacji (<i>ang. advanced glycation end products</i>)
ALEs	produkty końcowe oksydacji lipidów (<i>ang. advanced lipid oxidation end-products</i>)
AOPP	produkty końcowe oksydacji białek (<i>ang. advanced oxidative protein products</i>)
BHMT	metylotransferaza betaina:homocysteina
CBS	β-syntaza cystationiny
CKD	przewlekła choroba nerek (<i>ang. chronic kidney disease</i>)
CRP	białko C-reaktywne (<i>ang. C-reactive protein</i>)
eNOS	śródbłonkowa syntaza tlenu azotu
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy
ELISA	test immunoenzymatyczny (<i>ang. enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ESRD	schyłkowa niewydolność nerek (<i>ang. end-stage renal disease</i>)
GFR	filtracja kłębuszkowa (<i>ang. glomerular filtration rate</i>)
HCTL	tiolakton homocysteiny
Hcy	homocysteina
HDL	lipoproteiny o dużej gęstości (<i>ang. high-density lipoprotein</i>)
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
IL-6	interleukina-6
IL-8	interleukina-8
IQR	przedział międzykwartylowy (<i>ang. interquartile range</i>)
LDL	lipoproteiny o małej gęstości (<i>ang. low-density lipoprotein</i>)
MCP-1	białko chemotaktyczne makrofagów typu 1 (<i>ang. monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MDA	malonyldialdehyd
MTHFR	reduktaza metylenotetrahydrofolianowa
Nε-Hcy- albumina	Nε-homocysteinylowana albumina
Nε-Hcy- hemoglobina	Nε-homocysteinylowana hemoglobina
NF-κB	czynnik jądrowy κB (<i>ang. nuclear factor κB</i>)
NO	tlenek azotu
PON1	paraoksonaza 1
PPAR-γ	receptor aktywowany proliferatorami peroksydomów typu γ
RAA	układ renina-angiotensyna-aldosteron
ROS	reaktywne związki tlenu (<i>ang. reactive oxygen species</i>)
SOD	dysmutaza nadtlenkowa (<i>ang. superoxide dismutase</i>)
TBARS	reaktywne produkty kwasu tiobarbiturowego (<i>ang. thiobarbituric acid reactive species</i>)
TGF-β	transformujący czynnik wzrostu β
tHcy	całkowite stężenie homocysteiny

TNF- α

czynnik martwicy nowotworów α

2. Wstęp

2.1. Przewlekła choroba nerek

2.1.1. Definicja

Przewlekłą chorobę nerek rozpoznaje się, gdy spełnione jest co najmniej jedno z poniższych kryteriów:

1) uszkodzenie nerek utrzymujące się ponad 3 miesiące, wyrażające się nieprawidłowościami morfologicznymi lub nieprawidłowościami w składzie krwi lub moczu, bądź nieprawidłowymi wynikami badań obrazowych.

2) GFR <60 ml/min/1,73m² powierzchni ciała przez co najmniej 3 miesiące, z uszkodzeniem lub bez uszkodzenia nerek (1-3).

Definicja przewlekłej choroby nerek została opracowana w 2002 roku przez grupę amerykańskich ekspertów Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) (1). Rok później międzynarodowa grupa Kidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO) zarekomendowała stosowanie tej definicji na całym świecie (2).

Klasyfikacja przewlekłej choroby nerek według wytycznych National Kidney Foundation (NKF) została przedstawiona w tabeli 1.

Tabela 1. Klasyfikacja przewlekłej choroby nerek wg NKF (3).

Stadium CKD	GFR (ml/min/1,73 m ²)	charakterystyka wg NKF
1	≥ 90	uszkodzenie nerek z prawidłowym lub zwiększonym GFR
2	60-89	uszkodzenie nerek z niewielkim zmniejszeniem GFR
3	30-59	umiarkowane zmniejszenie GFR
4	15-29	duże zmniejszenie GFR
5	<15 lub leczenie dializami	niewydolność nerek

Określenie „przewlekła niewydolność nerek”, stosowane uprzednio w stosunku do wszystkich chorób nerek z towarzyszącym obniżeniem filtracji kłębuszkowej, ograniczono do grupy przewlekłych chorób nerek z GFR <15 ml/min/ 1.73 m², zwykle z towarzyszącymi objawami klinicznymi mocznicy i wskazaniami do rozpoczęcia leczenia nerkozastępczego - dializ lub przeszczepienia nerki (3).

2.1.2. Epidemiologia przewlekłej choroby nerek

Według danych opublikowanych przez NKF, opartych na rezultatach przeprowadzonego w latach 1988-1994 badania NHANES III (The Third National Health and Nutrition Examination Survey) oraz US Renal Data System (w odniesieniu do stadium 5 CKD), stadium 1 CKD stwierdza się u 3,3% populacji USA, stadium 2 u 3%, 3 u 4,3%, 4 u 0,2% i 5 u 0,1% (3). Zhang i wsp. na podstawie systematycznego przeglądu publikacji dostępnych w bazie MEDLINE ocenili częstość występowania CKD (niezależnie od stadium) na 7,2% w populacji ≥ 30 roku życia. Częstość występowania CKD u osób powyżej 64 roku życia oceniono na 23,4-35,8% (4). Przeprowadzone w populacji polskiej badanie PolNef wykazało obecność albuminurii jako wskaźnika uszkodzenia nerek u 11,9% z 2471 badanych. U co najmniej 9% uczestników badania, u których potwierdzono występowanie albuminurii, stwierdzono $GFR < 60$ ml/min/1,73m² (5).

Czynniki demograficzne zwiększające ryzyko rozwoju CKD to poza wiekiem płeć męska oraz rasa (6). Populacja Afroamerykanów zamieszkujących USA jest znacznie bardziej narażona na występowanie CKD niż przedstawiciele innych ras. Wśród Afroamerykanów stwierdzono siedmiokrotnie częstsze występowanie niecukrzycowej ESRD i czterokrotnie częstsze występowanie nefropatii cukrzycowej prowadzącej do schyłkowej niewydolności nerek (7). Predyspozycje etniczne tylko częściowo można wytłumaczyć czynnikami takimi jak styl życia, otyłość, status materialny i dostęp do opieki medycznej. Prowadzone w ostatnich latach badania genetyczne wskazują na związek pomiędzy rozwojem ESRD a występowaniem mutacji genu kodującego łańcuchy ciężkie nie związanej z mięśniami miozyny 9 (*non-muscle myosin heavy chain 9* – MYH9). Mutacja ta ma powodować u genetycznie predysponowanych osób rasy czarnej postępujące szkliwienie kłębuszków nerkowych, związane uprzednio z opornym na leczenie nadciśnieniem tętniczym (8).

Inne czynniki genetyczne związane najprawdopodobniej z ryzykiem progresji CKD to polimorfizm genów: konwertazy angiotensyny, IL-6, TNF- α i PPAR- γ (9,10).

Elementy stylu życia, które częściej występują u osób z CKD to palenie tytoniu, otyłość oraz nadmierne spożycie soli (6).

Badania przeprowadzone wśród mieszkańców USA wykazały, że jedynie u 2% pacjentów z CKD obserwuje się progresję do schyłkowej niewydolności nerek. Dysproporcja ta wynika w dużej mierze z wysokiej śmiertelności w tej populacji chorych, sięgającej wśród pacjentów w 4 stadium CKD ok. 45% w 5-letnim okresie obserwacji. Dominującymi przyczynami zgonów są choroby układu sercowo-naczyniowego (11). Odległe obserwacje wykazały, że istotny klinicznie spadek GFR w okresie 5-letnim

występuje u mniej niż 5% chorych z CKD a ryzyko progresji do ESRD na każdym etapie choroby jest kilkakrotnie mniejsze niż ryzyko zgonu (11,12). Niezależnymi czynnikami ryzyka progresji CKD są białkomocz i nadciśnienie tętnicze. Znaczenie w postępie CKD przypisuje się również obecności takich zaburzeń jak: hiperlipidemia, niedokrwistość i kwasica metaboliczna (6).

2.1.3. Metody oznaczania GFR

Poziom kreatyniny w surowicy nie jest wystarczająco czułym wskaźnikiem czynności wydalniczej nerek. Do wzrostu poziomu kreatyniny powyżej górnej wartości normy dochodzi zwykle wtedy, gdy filtracja kłębuszkowa zmniejsza się o ok. 50%. Ponadto na poziom kreatyniny wpływają inne, niezależne od GFR czynniki: wiek, płeć, rasa i masa mięśniowa (13). Metody oznaczania filtracji kłębuszkowej w oparciu o inne niż kreatynina substancje, takie jak inulina czy substancje znakowane izotopami są z racji trudności w ich wykonaniu i stosunkowo wysokich kosztów wykonywane w ograniczonym zakresie, zwykle w badaniach naukowych. Z kolei wykonanie 24-godzinnej zbiórki moczu w celu obliczenia klirensu kreatyniny niesie ze sobą ryzyko popełnienia błędów przedlaboratoryjnych i jest niekiedy trudne do wykonania w warunkach ambulatoryjnych (13,14). Wytyczne NKF zalecają w codziennej praktyce obliczanie wartości GFR za pomocą skróconego wzoru MDRD (Modification of Diet in Renal Diseases) lub wzoru Cockrofta – Gaulta (3).

Wzór Cockrofta – Gaulta (15):

$$C_{Cr} [\text{ml/min}] = (140 - \text{wiek}) \times \text{waga}/72 \times S_{Cr} \times 0,85 \text{ (dla kobiet)}$$

Skrócony wzór MDRD (16):

$$\text{GFR} [\text{ml/min}/1,73\text{m}^2] = 186 \times (S_{Cr})^{-1,154} \times (\text{wiek})^{-0,203} \times 0,742 \text{ (dla kobiet)} \times 1,210 \text{ (dla Afroamerykanów)}$$

gdzie:

C_{Cr} – klirens kreatyniny

S_{Cr} – stężenie kreatyniny w surowicy [mg/dl]

wiek – w latach

waga – w kilogramach.

Wykazano, że wzór MDRD jest bardziej dokładny u osób z $\text{GFR} < 90 \text{ ml/min}/1,73 \text{ m}^2$ (17). Stwierdzono jednakże, że zastosowanie wzoru MDRD zwykle zaniża, natomiast

wzoru Cockrofta – Gaulta zawyża wartość GFR u osób z prawidłową czynnością nerek (18). Rule i wsp. wykazali słabą korelację pomiędzy wartością GFR obliczoną za pomocą obu wzorów a wartością oznaczoną metodami laboratoryjnymi u zdrowych osób (19). Jednakże w większości przypadków zastosowanie jednego z powyższych wzorów daje rezultaty wystarczająco dokładne do zastosowania w codziennej praktyce klinicznej. Istotnym warunkiem uzyskania porównywalnych i powtarzalnych wyników jest standaryzacja metod oznaczania poziomu kreatyniny w surowicy stosowanych w różnych pracowniach analitycznych (13). W Polsce, zgodnie z zaleceniami zespołu Konsultanta Krajowego w Dziedzinie Nefrologii oraz Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego, do powszechnego użytku dla osób dorosłych zalecany jest skrócony wzór MDRD (14).

2.1.4. Przyczyny przewlekłej choroby nerek

Obecnie najczęstszymi przyczynami przewlekłej choroby nerek są nadciśnienie tętnicze i cukrzyca (4,20,21). Udział kłębuszkowych zapaleń nerek oraz chorób infekcyjnych układu moczowego w etiologii CKD systematycznie maleje, przynajmniej w krajach wysoko rozwiniętych (22). Z uwagi na bezobjawowy, często wieloletni przebieg znacząca część przypadków CKD pozostaje nierozpoznana aż do chwili wystąpienia objawów schyłkowej niewydolności nerek, co w pewnej mierze może ograniczać rzetelność wyników analiz epidemiologicznych. Dokładniejsze rejestry są prowadzone dla pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek poddawanych leczeniu nerkozastępczemu.

Według opublikowanego w 2007 roku raportu US Renal Data System najczęstszą przyczyną schyłkowej niewydolności nerek w USA jest nefropatia cukrzycowa, odpowiedzialna za niemal 46% przypadków rozpoczęcia terapii nerkozastępczej. Kolejną przyczyną schyłkowej niewydolności nerek, szczególnie wśród chorych w podeszłym wieku, jest miażdżyca naczyń nerkowych (23).

W Polsce, według raportu Krajowego Konsultanta w Dziedzinie Nefrologii, najczęstszą przyczyną schyłkowej niewydolności nerek u pacjentów, u których rozpoczęto w 2005 roku leczenie nerkozastępcze, jest nefropatia cukrzycowa, odpowiadająca za 27,16% przypadków. Kolejne pod względem częstości przyczyny ESRD to: kłębuszkowe zapalenia nerek (18,57%) i nefropatia nadciśnieniowa (14,38%). U około 10% chorych przyczyny schyłkowej niewydolności nerek nie udaje się ustalić (14).

2.1.5. Patofizjologia przewlekłej choroby nerek.

Niezależnie od pierwotnej przyczyny przewlekłej choroby nerek osiągnięcie określonego poziomu uszkodzenia narządu powoduje stałe, postępujące, zwykle nieodwracalne zmiany, które w znacznym odsetku przypadków prowadzą do schyłkowej niewydolności nerek (24). Istnieje kilka teorii tłumaczących zmiany patofizjologiczne zachodzące w przewlekłej chorobie nerek. Według teorii Brennera, zwanej również teorią hiperfiltracji, reakcją na ogniskowe zniszczenie nefronów jest hiperfiltracja i przerost pozostałych nefronów, które początkowo kompensują uszkodzenie, ale z czasem podlegają procesom stwardnienia kłębuszków i atrofii cewek z następowym rozwojem zmian zapalnych i włóknienia w tkance śródmiąższowej (25). Mechanizmy odpowiedzialne za hiperfiltrację i przerost nieuszkodzonych nefronów nie zostały dotychczas dokładnie zdefiniowane. Liczne dowody pośrednie wskazują na znaczącą rolę aktywacji wewnątrznerkowego układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) w patogenezie stwardnienia kłębuszków nerkowych (26,27). W tym „hemodynamicznym” modelu przewlekłej choroby nerek kluczową rolę odgrywa angiotensyna II, powodując zwiększenie ciśnienia wewnątrz-kłębuszkowego oraz nasilając ekspresję i aktywność czynników profibrotycznych: transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β) i inhibitora aktywatora plazminogenu typu-1 (PAI-1) (26). Kolejnym pośrednim dowodem istotnej roli aktywacji układu RAA w patogenezie przewlekłej choroby nerek jest działanie renoprotekcyjne inhibitorów konwertazy angiotensyny, wykraczające poza ich efekt hipotensyjny. Działanie to wykazano w szeregu badań klinicznych, między innymi Collaborative Study Group, REIN (Ramipril Efficacy In Nephropathy) i AIPRI (The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency) (28).

Teoria hiperfiltracji nie tłumaczy najprawdopodobniej wszystkich zmian patofizjologicznych odpowiedzialnych za postęp przewlekłej choroby nerek. Znaczącą rolę w progresji uszkodzenia nerek odgrywają również zmiany zachodzące w cewkach nerkowych i tkance śródmiąższowej, prowadzące do zaniku cewek i włóknienia śródmiąższu (24,29). Głównymi czynnikami powodującymi przewlekłe uszkodzenie cewkowo-śródmiaższowe są białkomocz oraz przewlekłe niedotlenienie nerek (30). Mechanizmy prowadzące do uszkodzenia nerek przez białkomocz są złożone. Masywny, nieselektywny białkomocz może powodować niedrożność cewek nerkowych a niektóre białka takie jak: czynniki wzrostowe, transferyna, albuminy i związane z nimi kwasy tłuszczowe oraz składowe dopełniacza mogą wywierać bezpośredni, uszkadzający wpływ na komórki nabłonka cewek nerkowych (24). Wykazano, że albuminy stymulują ekspresję cytokin i chemokin w komórkach nabłonka cewek proksymalnych poprzez wzrost

generacji wolnych rodników tlenowych z następującą aktywacją czynnika jądrowego κB (NF κB) (31-33). Związane z albuminami kwasy tłuszczowe nasilają apoptozę komórek nabłonka cewkowego (34). Przeładowanie komórek nabłonka cewek proksymalnych białkiem prowadzi do nieprawidłowej aktywacji składowych dopełniacza i w efekcie do dalszego uszkodzenia nerek (24).

Kolejnym czynnikiem powodującym postępujące uszkodzenie cewek i śródmiąszu nerek jest ich przewlekłe niedotlenienie. Może być ono spowodowane obkurczeniem naczyń wywołanym lokalną aktywacją układu RAA, zmniejszeniem syntezy tlenku azotu, niedokrwistością towarzyszącą przewlekłej chorobie nerek oraz zanikiem kapilar okołocewkowych (24,29). Przewlekłe niedotlenienie indukuje fibroblasty, powoduje zmiany w metabolizmie macierzy pozakomórkowej oraz wywołuje transformację komórek nabłonka cewkowego do miofibroblastów, co w końcowym efekcie prowadzi do nasilonego włóknienia cewkowo-śródmiąszowego (35-38). Przewlekłe niedotlenienie powoduje również upośledzenie czynności mechanizmów neutralizujących działanie wolnych rodników, między innymi zależnej od miedzi i cynku dyzmutazy nadtlenkowej (Cu/Zn-SOD), co prowadzi do nasilenia stresu oksydacyjnego (39).

2.1.6. Stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny to zjawisko uszkodzenia tkanek na skutek zaburzenia równowagi pomiędzy powstawaniem substancji o działaniu utleniającym a sprawnością mechanizmów odpowiedzialnych za ich rozpad (40-42).

Głównym źródłem związków o silnych właściwościach utleniających, odgrywających znaczącą rolę w patogenezie stresu oksydacyjnego, są aktywowane makrofagi. Pod wpływem stymulacji przez granulocyty obojętnochłonne o polimorficznych jądrach (*polymorphonuclear neutrophils* – PMNs) produkują one reaktywne związki tlenu (*reactive oxygen species* – ROS): anion nadtlenkowy (O_2^-), który jest niestabilny i ulega szybkiej przemianie do nadtlenku wodoru (H_2O_2). Anion nadtlenkowy i nadtlenek wodoru są prekursorami kolejnych oksydantów. O_2^- wchodzi w reakcję z tlenkiem azotu (NO) prowadząc do powstawania silnie reaktywnych związków azotowych. Nadtlenek wodoru wchodzi w reakcję z atomami żelaza dając w efekcie rodniki hydroksylowe (OH^\cdot), odpowiedzialne za uszkodzenie błon komórkowych, agregację białek i uszkodzenie DNA (41,43). Nadtlenek wodoru jest ponadto substratem dla obecnego w fagocytach enzymu mieloperoksydazy (MPO), który katalizuje powstawanie aktywnych związków chloru, głównie kwasu podchlorowego (OCl^\cdot). Kwas podchlorowy odpowiedzialny jest za

uszkodzenie lipidów, proteoglikanów i innych składników błon komórkowych, w tym grup tiolowych białek. Wchodzi również w reakcję z grupami aminowymi białek prowadząc do powstawania chloramin (41).

Ważnym źródłem ROS są mitochondria. Około 1-2% komórkowego metabolizmu tlenu, zachodzącego w mitochondrialnym układzie cytochromów, prowadzi do powstawania reaktywnych związków tlenowych (40).

ROS z uwagi na swą wysoką reaktywność charakteryzują się bardzo krótkim, wyrażonym w sekundach czasem półtrwania, w związku z czym oznaczanie ich *in vivo* jest trudne. Jako markerów stresu oksydacyjnego używa się substancji modyfikowanych przez reaktywne związki tlenu, które są znacznie bardziej stabilne (41).

Reakcja oksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych prowadzi do fragmentacji ich cząsteczek i powstawania aldehydów: akroleiny, malonyldialdehydu (MDA), 4-hydroksynonenalu (HNE) oraz reaktywnych związków kwasu tiobarbiturowego (41,44). Niezależna od cyklooksygenazy, nieenzymatyczna oksydacja kwasu arachidonowego powoduje powstawanie związków o budowie zbliżonej do prostaglandyny F₂, nazywanych F₂-izoprostanami. F₂-izoprostany powstają *in situ* w cząsteczkach fosfolipidów, a następnie na skutek działania fosfolipazy A₂ są uwalniane do osocza, występując tam w formie wolnej (40). Szczególną uwagę zwrócono na jeden ze związków z tej grupy, 8-izo-PGF_{2α}, który jest nie tylko markerem stresu oksydacyjnego, ale wykazuje również aktywność proaterogenną związaną z powinowactwem do receptora dla tromboksanu A₂ (42,45). Innymi produktami nieenzymatycznej oksydacji kwasu arachidonowego są izolewuglandyny, które w odróżnieniu od izoprostanów nie występują w osoczu w formie wolnej, tylko są w całości związane z białkami (46). Wykazano, że zarówno związki będące produktami końcowymi oksydacji lipidów (*advanced lipid oxidation end-products* – ALEs), jak i specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko niektórym z nich, np. oksydowanemu LDL są użytecznymi wskaźnikami nasilonego stresu oksydacyjnego (47).

Produktami oksydacyjnego uszkodzenia białek są odporne na proteolizę agregaty, zwane AOPP (*advanced oxidative protein products*). Oksydacja reszt aminokwasów (szczególnie tyrozyny) w łańcuchu peptydowym prowadzi do powstawania specyficznych produktów, które mogą służyć jako markery reakcji oksydacyjnych (40). Katalizowane przez obecny w makrofagach enzym mieloperoksydazę przemiany aminokwasów prowadzą do kumulacji aldehydów: glioksalowego, metyloglioksalowego i akroleiny. Zjawisko nagromadzenia aldehydów wskutek reakcji oksydacji nosi nazwę „stresu karbonylowego”

(48). Aldehydy zawierające wysoce reaktywne grupy karbonylowe biorą czynny udział w syntezie produktów końcowych glikacji (*advanced glycation end products* – AGE), związków odgrywających istotną rolę patogenezie miażdżycy (40). Reaktywne związki tlenowe mogą również wchodzić w reakcję z kwasami nukleinowymi prowadząc do powstawania mutacji oraz onkogenezy (41).

Wewnątrzkomórkowe mechanizmy obronne przeciwko szkodliwemu działaniu wolnych rodników obejmują enzymy: dyzmutazę nadtlenkową, katalazę, peroksydazę glutationową zawierająca selen oraz systemy nieenzymatyczne: glutation, tokoferol (wit. E) oraz kwas askorbinowy (41). Pozakomórkowe systemy eliminujące wolne rodniki to w głównej mierze grupy tiolowe zlokalizowane w cząsteczkach albumin oraz kwas askorbinowy (40).

U chorych z przewlekłą chorobą nerek równowaga pomiędzy czynnikami pro i antyoksydacyjnymi przesunięta jest w kierunku zwiększonego stresu oksydacyjnego. Wykazano niedostateczną sprawność szeregu mechanizmów obronnych: niedobór witaminy C (spowodowany restrykcjami dietetycznymi oraz jej utratą w czasie hemodializ), zubożenie komórek w witaminę E, obniżony poziom selenu oraz niedobór glutationu (46,49). Jednocześnie u chorych z ESRD obserwuje się nasilenie procesów oksydacyjnych, związane z częstym występowaniem cukrzycy, przewlekłych stanów zapalnych, nierzadko zaawansowanym wiekiem chorych oraz z czynnikami związanymi z leczeniem nerkozastępczym (41). Stres oksydacyjny związany z hemodializami wynika głównie z niedostatecznej biokompatybilności błon dializacyjnych, długotrwałej obecności cewników w naczyniach oraz ekspozycji na endotoksyny bakteryjne zawarte w wodzie (40,41).

2.2. Choroby sercowo-naczyniowe w przewlekłej chorobie nerek

Pacjenci z CKD, a w szczególności chorzy ze schyłkową niewydolnością nerek leczeni dializami, są obciążeni znamienne większym ryzykiem rozwoju miażdżycy, a w jej następstwie incydentów sercowo-naczyniowych (50-52). Ocenia się, że częstość występowania choroby wieńcowej u pacjentów leczonych przewlekłe dializami (zarówno hemodializami, jak i dializą otrzewnową) wynosi około 40%, a śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych jest 10-20 razy większa niż w populacji ogólnej (53-55). Różnica ta jest szczególnie wyraźna wśród osób młodych, pomiędzy 25 a 34 rokiem życia, u których śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych jest nawet 500 razy większa

wśród pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek niż w odpowiadającej jej wiekiem populacji z prawidłową czynnością nerek (56). Około 50% zgonów pacjentów przewlekle dializowanych jest następstwem chorób układu sercowo-naczyniowego (50-53). Związek pomiędzy zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym a upośledzoną czynnością nerek został wykazany również w grupie pacjentów z wcześniejszymi stadiami przewlekłej choroby nerek (57). Stwierdzono, że większość chorych w stadium 3 i 4 CKD (GFR <60 ml/min/1,73m²) umiera wskutek epizodów sercowo-naczyniowych, a nie z powodu progresji przewlekłej choroby nerek (56).

Na zwiększoną zachorowalność pacjentów z CKD na choroby układu sercowo-naczyniowego mają wpływ zarówno uznane czynniki ryzyka występujące w populacji ogólnej takie jak: nadciśnienie tętnicze, dyslipidemia, cukrzyca, nadwaga lub otyłość oraz palenie tytoniu, jak i czynniki związane bezpośrednio z przewlekłą chorobą nerek: objętościowe przeciążenie układu krążenia, niedokrwistość, zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej, stres oksydacyjny, albuminuria, przewlekły stan zapalny, zaburzenia elektrolitowe (szczególnie hipo i hiperkaliemia) oraz kwasica metaboliczna (58-61). U chorych ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych hemodializami istotne są również czynniki ryzyka specyficzne dla tej formy leczenia nerkozastępczego takie jak: nagłe zmiany objętości płynu pozakomórkowego w czasie dializy oraz w okresie pomiędzy dializami, wahania ciśnienia tętniczego krwi, szybkie zmiany poziomu elektrolitów, niedostateczna biozgodność błon dializacyjnych oraz zanieczyszczenia (szczególnie bakteryjne) płynu dializacyjnego (53,62).

Wykazano, że tradycyjne czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego występują u chorych z CKD częściej niż w populacji ogólnej. Analiza ponad 6500 uczestników badania Framingham Heart Study wykazała znacznie częstsze występowanie wszystkich uznanych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego (poza paleniem tytoniu) wśród chorych z umiarkowanym upośledzeniem czynności wydalniczej nerek, wyrażonym poziomem kreatyniny w surowicy >1,5 mg/dl, w porównaniu z osobami z prawidłową czynnością nerek. Różnice te były szczególnie wyraźne wśród kobiet uczestniczących w badaniu. Nadciśnienie tętnicze stwierdzono 1,6 razy częściej u kobiet z CKD niż u badanych z prawidłową czynnością nerek, cukrzycę 2,3 razy częściej, hipercholesterolemię 1,5 razy a nadwagę 1,2 razy częściej. Wszystkie różnice były istotne statystycznie. Wśród mężczyzn z CKD zamiennie częściej występowała cukrzyca (1,8-krotnie) i nadwaga (1,1-krotnie). Pozostałe czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego również występowały częściej u chorych z CKD, ale różnice nie były istotne statystycznie (63). Także w innych badaniach

wykazano istotnie częstsze występowanie otyłości, zaburzeń gospodarki lipidowej oraz nadciśnienia tętniczego, jak również rzadsze osiągnięcie optymalnych rezultatów terapii hipotensyjnej u chorych z przewlekłą chorobą nerek w porównaniu do osób z prawidłową czynnością nerek (64,65).

W badaniu Framingham Heart Study stwierdzono, że umiarkowanie upośledzona czynność wydalnicza nerek powodowała w 15-letnim okresie obserwacji znaczący wzrost ryzyka zgonu wśród mężczyzn. Częstość występowania chorób układu sercowo-naczyniowego była o 64% wyższa u tych uczestników badania, u których stwierdzono upośledzenie czynności nerek w porównaniu do osób z ich prawidłową czynnością (56,63). Analiza wyników badania HOT (Hypertension Optimal Treatment) wykazała znamienne zwiększenie współczynnika ryzyka zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych oraz zgonu niezależnie od przyczyny wśród tych spośród ponad 18 tysięcy pacjentów z nadciśnieniem tętniczym objętych obserwacją, u których stwierdzono upośledzoną czynność nerek (66). Zbliżone rezultaty przyniosło badanie przeprowadzone przez Go i wsp., którzy na podstawie trwającej średnio 2,84 roku obserwacji ponad miliona pacjentów z upośledzoną czynnością nerek ($GFR \leq 60$ ml/min) wykazali istotne, niezależne od innych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego zwiększenie ryzyka zgonu oraz wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego, wzrastające wraz z obniżeniem wartości GFR (67).

Coraz więcej danych wskazuje, że podwyższone stężenie homocysteiny w osoczu jest istotnym czynnikiem ryzyka sercowo-naczyniowego u chorych z CKD, choć rezultaty przeprowadzonych badań nie są jednoznaczne. Prospektywne badanie obejmujące 73 osoby ze schyłkową niewydolnością nerek wykazało siedmiokrotny wzrost ryzyka wystąpienia zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych i 3,5-krotny wzrost ryzyka wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego u chorych z poziomem tHcy ≥ 27 μ mol/l w porównaniu do pacjentów z niższym poziomem tHcy (68). Również w kolejnych badaniach wykazano zwiększone ryzyko sercowo-naczyniowe u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek i hiperhomocysteinemią (69-73). Jednakże w innych badaniach nie stwierdzono związku pomiędzy podwyższonym poziomem homocysteiny a zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym (74-76), a nawet wykazano zwiększoną śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych u chorych z niskim poziomem tHcy (77-79). Jest to związane prawdopodobnie z obserwowanym u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek tzw. zjawiskiem „odwróconej epidemiologii”, kiedy to niski poziom tHcy współistnieje z niedożywieniem, przewlekłym stanem zapalnym i nasiloną miażdżycą naczyń (teoria MIA – *malnutrition, inflammation, atherosclerosis*), co wydaje się być

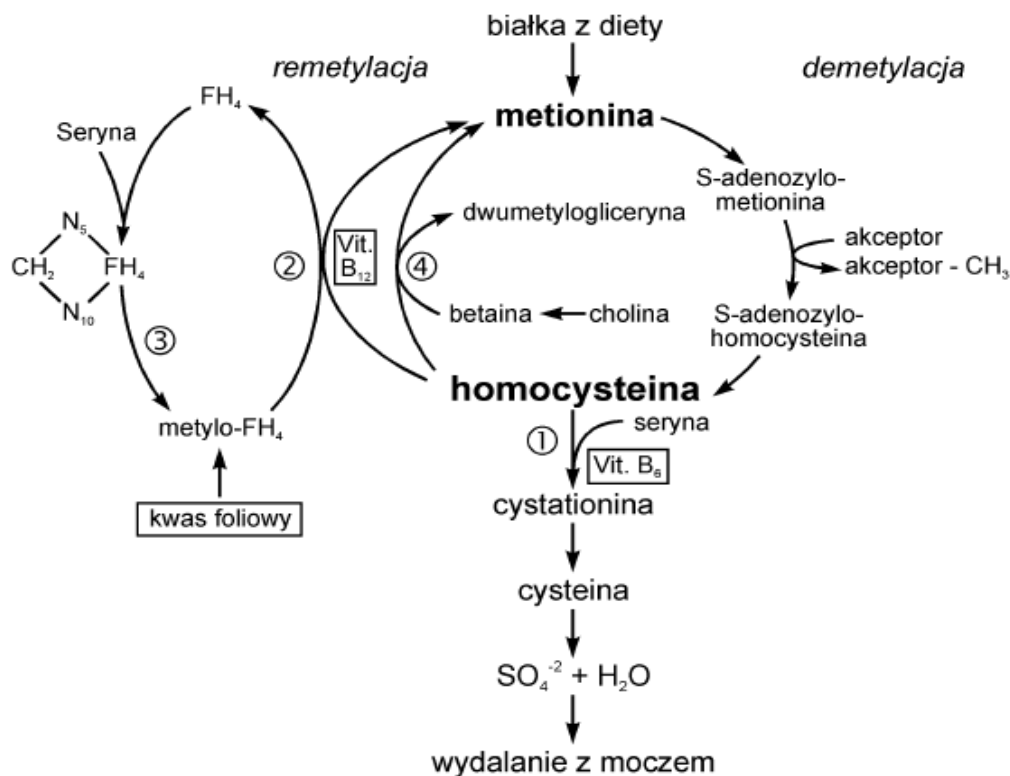
istotnym czynnikiem ryzyka sercowo- naczyniowego w tej grupie chorych (80-82). Interpretując zależność pomiędzy poziomem homocysteiny a ryzykiem sercowo-naczyniowym należy także wziąć pod uwagę, że oznaczanie poziomu całkowitej homocysteiny nie odzwierciedla dokładnie poziomu tych jej metabolitów, które są najistotniej związane z rozwojem miażdżycy, głównie tiolaktonu homocysteiny (83,84).

2.3. Homocysteina i jej metabolizm

Homocysteina jest aminokwasem zawierającym siarkę, powstającym w organizmie na drodze demetylacji metioniny, jednego z podstawowych aminokwasów dostarczanych z pokarmami białkowymi. Produktami pośrednimi reakcji demetylacji są: S-adenozylometionina (SAM) oraz S-adenozylhomocysteina (SAH). Metabolizm homocysteiny odbywa się przez dwa główne szlaki: transsulfurację i remetylację. W warunkach fizjologicznych, to jest przy prawidłowej podaży metioniny, około 50% homocysteiny podlega transsulfuracji do cysteiny. Reakcja ta jest katalizowana przez enzym β -syntazę cystationinową (CBS), której kofaktorem jest fosforan pirydoksalu (witamina B₆). Pozostałe 50% homocysteiny zostaje poddane remetylacji do metioniny. Głównym szlakiem remetylacji, obecnym w większości tkanek, jest reakcja katalizowana przez syntazę metioninową (SM). Kofaktorem tej reakcji jest pochodna witaminy B₁₂ – metylokobalamina a donorem grup metylowych jest 5-metylotetrahydrofolian. Związek ten powstaje z 5,10-metylenotetrahydrofolianu w reakcji katalizowanej przez reduktazę metylenotetrahydrofolianową (MTHFR). Alternatywną drogą remetylacji, obecną w wątrobie i nerkach, jest reakcja katalizowana przez metylotransferazę betaina:homocysteina (BHMT). Enzym ten wymaga jako kofaktora fosforanu pirydoksalu. Donorem grup metylowych jest w tej reakcji betaina. (85-87).

W warunkach fizjologicznych około 75% całkowitej homocysteiny stanowi frakcja związana wiązaniem dwusiarczkowym z białkami, głównie z albuminą. Większość wolnej homocysteiny występuje w postaci utlenionej, tworząc połączone wiązaniem dwusiarczkowym heterodimery z cysteiną (Hcy-cysteina) lub homodimery (Hcy-Hcy). Około 1-2% całkowitej homocysteiny stanowi jej wolna, zredukowana forma. Homocysteina występuje również w osoczu w niewielkich ilościach (0,002-0,3% tHcy) jako forma tiocykliczna, tiolakton homocysteiny (88).

Ryc. 1. Metabolizm homocysteiny (86).



- 1 - β -syntaza cystationinowa 3 – reduktaza metylenotetrahydrofolianowa
 2 – syntaza metioninowa 4 – metylotransferaza betaina:homocysteina

2.4. Hiperhomocysteinemia – definicja i przyczyny

Zakres prawidłowych wartości stężenia tHcy w osoczu krwi różni się w zależności od charakterystyki badanej populacji. Jako punkt odcięcia przyjmuje się zwykle wartość 97,5 percentyla dla osób uznanych za zdrowe w badanej populacji. W krajach stosujących wzbogacanie żywności w kwas foliowy (np. USA) górny zakres wartości referencyjnych wynosi ok. 12 $\mu\text{mol/l}$. W pozostałych krajach zakres ten jest wyższy i wynosi ok. 15 $\mu\text{mol/l}$

(89). Hiperhomocysteinemię, definiowaną jako patologiczne podwyższenie poziomu tHcy w osoczu lub surowicy krwi (90), dzieli się tradycyjnie na łagodną (poziom homocysteiny w osoczu na czczo 15-30 $\mu\text{mol/l}$), umiarkowaną (30-100 $\mu\text{mol/l}$) i ciężką (>100 $\mu\text{mol/l}$) (91,92).

Czynniki modyfikujące stężenie tHcy w osoczu krwi można podzielić na kilka grup. Pierwsza z nich to czynniki demograficzne: wiek, płeć męska oraz okres pomenopauzalny u kobiet. Kolejna grupa to czynniki związane ze stylem życia: niedostateczne spożycie

witamin z grupy B i kwasu foliowego, dieta bogatobiałkowa, palenie tytoniu, nadmierne spożycie kofeiny oraz niski poziom aktywności fizycznej. Na poziom tHcy mają także wpływ niektóre schorzenia takie jak: przewlekła choroba nerek, niektóre nowotwory (białaczka limfoblastyczna, guzy jajnika, sutka i trzustki), łuszczyca, toczeń rumieniowaty czy cukrzyca, jak również przewlekłe stosowanie niektórych leków: antagonistów kwasu foliowego (metotreksat, cholestyramina, leki przeciwdrgawkowe), antagonistów witaminy B₆ (teofilina, niacyna) i kobalaminy (metformina). Inne leki podwyższające poziom tHcy to: L-dopa, cyklosporyna, aminoglutetymid, fibraty oraz leki moczopędne (86,89).

Podwyższone stężenie tHcy może być uwarunkowane genetycznymi defektami enzymów biorących udział w metabolizmie metioniny. Najczęstszą genetycznie uwarunkowaną przyczyną hiperhomocysteinemii jest polimorfizm genu kodującego MTHFR, polegający na punktowej zamianie cytozyny na tyminę w pozycji 677 (C677T). Mutacja ta powoduje obniżoną o około 50% aktywność MTHFR, co prowadzi do zmniejszenia syntezy 5-metylotetrahydrofolianu, aktywnej formy kwasu foliowego niezbędnej do remetylacji homocysteiny do metioniny (93). Homozygoty TT charakteryzują się umiarkowanie większym stężeniem tHcy (średnio o 2,5 μmol/l) niż homozygoty CC. Częstość występowania wariantu TT ocenia się na ok. 10-30% (89,94). Inny, rzadziej występujący polimorfizm genu MTHFR, A1298C ma niewielkie znaczenie w patogenezie hiperhomocysteinemii (95,96).

Mutacje genu kodującego CBS to rzadkie defekty, związane z ciężkimi postaciami hiperhomocysteinemii, którym towarzyszy przedwczesny rozwój miażdżycy tętnic, zwiększona częstość występowania zatorów tętniczych oraz zaburzenia neurologiczne (89,95).

2.5. Hiperhomocysteinemia w przewlekłej chorobie nerek.

Hiperhomocysteinemia występuje często u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (97,98). Wśród chorych z GFR <15 ml/min hiperhomocysteinemię stwierdza się u 80-100% pacjentów (99,100). Mechanizmy odpowiedzialne za podwyższenie poziomu tHcy w przewlekłej chorobie nerek nie zostały dotychczas dokładnie poznane. Jednym z nich jest obniżenie klirensu nerkowego homocysteiny. Wykazano istnienie silnej, odwrotnej korelacji pomiędzy poziomem tHcy w osoczu a wielkością filtracji kłębuszkowej, ocenianą zarówno miarą klirensu kreatyniny, jak i metodami radioizotopowymi. Stwierdzono

również korelację pomiędzy poziomem cystatyny C, innego czułego wskaźnika czynności filtracyjnej kłębuszków nerkowych a poziomem Hcy w osoczu (97,100).

Homocysteina, jak niemal wszystkie aminokwasy, jest aktywnie resorbowana zwrotnie w cewce bliższej nefronu. Zaledwie 1% homocysteiny docierającej do cewki proksymalnej jest ostatecznie wydalany z moczem. Wchłonięta zwrotnie homocysteina jest metabolizowana w nerkach do cysteiny, głównie na drodze transsulfuracji (97,101). Wpływ zaburzeń nerkowego metabolizmu homocysteiny na rozwój hiperhomocysteinemii w przebiegu przewlekłej choroby nerek nie został do chwili obecnej dokładnie określony.

Niedobór witamin biorących udział w metabolizmie homocysteiny, to jest kwasu foliowego i witamin B₆ i B₁₂, odgrywa prawdopodobnie mniejszą rolę w patogenezie hiperhomocysteinemii u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek niż obniżenie klirensu nerkowego homocysteiny. Rezultaty badań oceniających wpływ suplementacji tych witamin, niekiedy w dawkach znacznie wyższych niż uznawane za terapeutyczne w populacji ogólnej, na poziom homocysteiny w osoczu chorych z przewlekłą chorobą nerek są niejednoznaczne. Niektóre z nich wskazują na istnienie oporności na tą formę terapii (102-107).

2.6. Mechanizmy toksycznego działania homocysteiny

2.6.1. Wpływ homocysteiny na śródbłonek naczyniowy

W badaniach *in vitro* stwierdzono, że inkubacja komórek śródbłonka w obecności homocysteiny prowadzi do zaburzenia ich wzrostu oraz nasilenia apoptozy. Stwierdzono także przyspieszenie procesu starzenia się komórek śródbłonka pod wpływem Hcy (94).

Jednym z istotnych mechanizmów odpowiedzialnych za dysfunkcję śródbłonka naczyniowego spowodowaną hiperhomocysteinemią jest upośledzenie zależnej od śródbłonka zdolności naczyń do rozkurczu. Zjawisko to jest związane z nasileniem stresu oksydacyjnego, zwiększoną syntezą wolnych rodników tlenowych i zaburzeniem funkcji śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS) (108-110). Hiperhomocysteinemii towarzyszy również wzrost stężenia asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA), która jest silnym endogennym inhibitorem eNOS. Przyczyn tego zjawiska upatruje się z jednej strony w indukowanej demetylacją metioniny aktywacji enzymów odpowiedzialnych za syntezę ADMA (metylotransferazy argininowo-białkowe), z drugiej zaś w spowodowanym hiperhomocysteinemią i nasilonym stresem oksydacyjnym zahamowaniu rozkładu ADMA przez enzym dimetyloarginino-dimetylaminohydrolazę (110-113).

Hiperhomocysteinemia powoduje również inaktywację eNOS na drodze jej fosforylacji związanej z aktywacją kinazy białkowej C (114) oraz poprzez modyfikację ekspresji kaweoliny-1 (Cav-1), cząsteczki odpowiedzialnej za właściwą lokalizację eNOS w śródbłonku (115). Hiperhomocysteinemii towarzyszy podwyższenie poziomu endoteliny-1 (ET-1), która jest substancją o najsilniejszym działaniu naczynioskurczowym, odgrywającą istotną rolę w rozwoju miażdżycy (116,117).

W modelu doświadczalnym wykazano również, że hiperhomocysteinemia powoduje nasilenie proliferacji komórek mięśni gładkich w ścianie naczyń krwionośnych, pogrubienie intymy oraz zwiększoną syntezę włókien kolagenowych (118).

2.6.2. Wpływ homocysteiny na procesy krzepnięcia krwi

Ciężka hiperhomocysteinemia towarzysząca genetycznie uwarunkowanej homocystynurii jest związana ze zwiększoną częstością występowania zatorów tętniczych. U większości chorych z tym defektem enzymatycznym epizody zakrzepowo-zatorowe występują przed ukończeniem 30 roku życia (119). Umiarkowana hiperhomocysteinemia również wiąże się z zaburzeniami krzepnięcia krwi i fibrynolizy. Zarówno w modelu zwierzęcym, jak i w obserwacjach klinicznych stwierdzono, że hiperhomocysteinemia związana jest ze zwiększoną agregacją płytek krwi i tworzeniem bogatych w płytki zakrzepów w miejscach uszkodzenia śródbłonka naczyniowego (110). Ponadto wykazano, że Hcy hamuje ekspresję trombomoduliny oraz indukuje ekspresję czynnika tkankowego w komórkach śródbłonka (120). Hcy zwiększa także ekspresję osoczowych czynników krzepnięcia: II, V, X i XII oraz upośledza aktywację układu białka C i antytrombiny (110,121-123). Udowodniono również, że hiperhomocysteinemia powoduje zmiany właściwości skrzepu fibrynowego, który staje się bardziej zbity i oporny na fibrynolizę (124).

2.6.3. Homocysteina a reakcja zapalna

W modelu *in vitro* wykazano, że hodowla komórek śródbłonka naczyniowego, komórek mięśni gładkich oraz monocytów w obecności homocysteiny powoduje ekspresję cytokiny MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) (125). MCP-1 nasila adhezję monocytów do powierzchni śródbłonka oraz ich migrację do przestrzeni podśródbłonkowej, co jest istotnym elementem powstawania wczesnych zmian miażdżycowych (126). Hcy zwiększa również ekspresję IL-6 (127), IL-8 (125) oraz innych mediatorów reakcji zapalnej (128). Indukowana przez Hcy ekspresja tych

substancji odbywa się za pośrednictwem aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF κ B, który jest czynnikiem stymulującym syntezę cytokin, chemokin, cząstek adhezji leukocytów oraz hemopoetycznych czynników wzrostu biorących udział w rozwoju reakcji zapalnej i miażdżycy (129).

2.6.4. Homocysteinyłacja białek

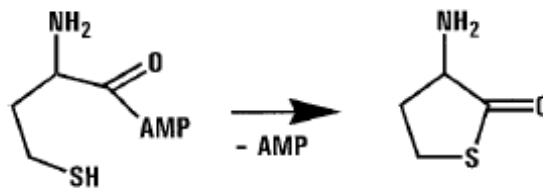
Homocysteina ma zdolność do tworzenia wiązań dwusiarczkowych z resztami cysteinowymi zawartymi w białkach. Reakcja ta jest nazywana S-homocysteinyłacją. Głównym S-homocysteinyłowanym białkiem osocza jest albumina. (88,130).

Przyłączenie Hcy do grup tiolowych uniemożliwia tworzenie mostków dwusiarczkowych odpowiedzialnych za trzeciorzędową strukturę białek oraz zmienia ich ładunek elektryczny, zaburzając przez to ich funkcję. Ponadto obecność dodatkowych grup –SH może zwiększać wrażliwość białek na uszkodzenie w mechanizmie utleniania (131). S-homocysteinyłacja białek może powodować związane z hiperhomocysteinemią zaburzenia krzepnięcia krwi. Wykazano, że S-homocysteinyłacja cząsteczki aktywowanego V osoczowego czynnika krzepnięcia jest przyczyną zahamowania procesu inaktywacji tego czynnika przez aktywowane białko C (121). S-homocysteinyłacja białka receptorowego dla tkankowego aktywatora plazminogenu powoduje zahamowanie aktywatora przez ten receptor (132). Z kolei S-homocysteinyłacja fibronektyny upośledza jej interakcję z fibryną, zaburzając procesy krzepnięcia oraz gojenia ran (133).

Innym zjawiskiem prawdopodobnie odgrywającym znaczącą rolę w aterogennym działaniu homocysteiny jest N-homocysteinyłacja białek. Molekularną podstawą N-homocysteinyłacji jest reakcja jednego z metabolitów Hcy, tiolaktonu homocysteiny (HCTL) z wolnymi grupami aminowymi reszt lizyny białek (134).

Tiolakton homocysteiny powstaje na skutek nieswoistej aktywacji Hcy przez syntetazę metionylo-tRNA, która następnie nie jest przenoszona na cząsteczkę tRNA lecz przekształcana w cykliczny tioester. Przemiana Hcy w HCTL ulega nasileniu w warunkach upośledzenia innych szlaków metabolizmu Hcy, to jest transsulfuracji i remetylacji, na skutek genetycznie uwarunkowanych zaburzeń aktywności enzymów katalizujących te reakcje lub w efekcie niedoboru kofaktorów: kwasu foliowego, witaminy B₁₂ lub B₆. HCTL jest wysoce reaktywnym związkiem, charakteryzującym się wysokim powinowactwem do grup ϵ -NH₂ lizyny białek, z którymi tworzy wiązania amidowe (134-136).

Ryc. 2. Powstawanie tiolaktonu homocysteiny (136).



Poziom wolnego HCTL w osoczu człowieka waha się w zakresie 0-35 nmol/l, co stanowi około 0,002-0,3% całkowitej homocysteiny. Wykazano, że poziom HCTL jest wyższy u mężczyzn niż u kobiet i wzrasta u mężczyzn wraz z wiekiem, choć ta korelacja nie była istotna statystycznie (137). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy poziomem tHcy a HCTL, co sugeruje, że poziom tHcy nie jest głównym czynnikiem warunkującym poziom HCTL. Czynniki, które mogą mieć wpływ na poziom HCTL są: poziom kwasu foliowego, poziom metioniny, czynność wydalnicza nerek oraz aktywność tiolaktonazy homocysteiny (136). Tiolaktonaza homocysteiny, zidentyfikowana wcześniej jako paraoksonaza, jest enzymem odpowiedzialnym za hydrolizę HCTL. Enzym ten łączy się z cząsteczką HDL-cholesterolu i wymaga do swojej aktywności obecności jonów wapnia (138).

Tiolakton homocysteiny jest wydalany z moczem. Stwierdzono, że klirens nerkowy HCTL stanowi 20-700% klirensu kreatyniny, co wskazuje na aktywne wydzielenie HCTL przez cewki nerkowe lub miejscową syntezę tego związku w nerce (139).

Jedną z właściwości HCTL jest jego zdolność do wchodzenia w reakcję acylacji z wolnymi grupami aminowymi, w szczególności grupami ϵ -NH₂ reszt lizynowych białek. Reakcja ta dokonuje się po translacji białek i nie wymaga udziału enzymu. Na jej skutek powstają N-homocysteinylowane białka (88,136). N-homocysteinyłacja białek powoduje zmianę ich struktury pierwszorzędowej, co skutkuje nabyciem przez nie nowych własności biochemicznych, odmiennymi interakcjami z innymi substancjami oraz indukowaniem odpowiedzi autoimmunologicznej. Zmiana sekwencji aminokwasów w łańcuchu białkowym spowodowana przyłączeniem Hcy powoduje powstawanie nieprawidłowych agregatów białkowych (136). Pojawienie się takich nowych cząsteczek w retikulum endoplazmatycznym indukuje apoptozę komórek (140). N-homocysteinyłacja białek wywołuje odpowiedź autoimmunologiczną (141) i nasila proces zapalny naczyń krwionośnych (142), co prowadzi do przyspieszenia rozwoju miażdżycy naczyń (141,143).

Reakcja N-homocysteinytacji dotyczy wszystkich badanych dotychczas białek, głównie hemoglobiny, albuminy, γ -globuliny, transferyny, HDL, LDL, α_1 - antytrypsyny i fibrynogenu (144). Największą pulę N-homocysteinyłowanych białek stanowi N-homocysteinyłowana hemoglobina (140). N-homocysteinyłacja powoduje zmianę własności białek. Wbudowanie Hcy do struktury białek enzymatycznych takich jak: oksydaza lizynowa, trypsyna czy paraoksonaza 1 powoduje utratę ich funkcji. (131,145,146). Homocysteinyłacja albumin i cytochromu c upośledza ich funkcję redox (147,148). Wykazano, że N-homocysteinyłowane LDL indukuje apoptozę komórek śródbłonna (149).

Stwierdzono, że fibrynogen łatwo ulega N-homocysteinyłacji *in vitro* (131,138). Wykazano również obecność N-homocysteinyłowanego fibrynogenu w organizmie człowieka (135). W modelu doświadczalnym wykazano, że skrzep utworzony w osoczu wzbogaconym w HCTL ulega fibrylizacji wolniej niż skrzep powstający w prawidłowym osoczu krwi. Wyjasniono to poprzez zidentyfikowanie reszt lizynowych białek podatnych na działanie HCTL w pobliżu miejsc w cząsteczce fibrynogenu odpowiedzialnych za wiązanie z tkankowym aktywatorem plazminogenu oraz plazminogenem, a także miejsc odgrywających rolę w inaktywacji plazminy (150). Wydaje się, że szkodliwy wpływ hiperhomocysteinemii na układ krzepnięcia i fibrylizacji związany jest głównie z modyfikacją właściwości fibrynogenu przez HCTL (124).

Jak wiele białek ulegających modyfikacji potranslacyjnej, N-homocysteinyłowane białka wywołują reakcję autoimmunologiczną, która wyraża się indukcją syntezy IgG skierowanych przeciwko epitopom N ϵ -Hcy-lizyny (140). Po raz pierwszy wykazano podwyższony poziom przeciwciał przeciwko N-homocysteinyłowanym białkom u pacjentów po udarze mózgu (151). Stwierdzono również podwyższony poziom tych przeciwciał u chorych z chorobą wieńcową (152), toczeniem rumieniowatym układowym (153) oraz u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych hemodializami (154).

Undas i wsp. (154) wykazali znamienne wyższy poziom przeciwciał przeciwko N ϵ -homocysteinyłowanym białkom w grupie 43 osób ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych przewlekle hemodializami w porównaniu z osobami zdrowymi. Średni poziom przeciwciał przeciwko N ϵ -homocysteinyłowanej albuminie był o 14% wyższy w grupie chorych, a poziom przeciwciał przeciwko N ϵ -homocysteinyłowanej hemoglobinie był wyższy w tej grupie o 42%. Nie wykazano związku pomiędzy poziomem przeciwciał a

przyczyną schyłkowej niewydolności nerek, wiekiem pacjentów, płcią, chorobami współistniejącymi i przewlekle stosowanymi lekami. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy poziomem przeciwciał a parametrami morfologii krwi obwodowej (za wyjątkiem liczby płytek krwi), poziomem białka C-reaktywnego, profilem lipidowym, poziomem ferrytyny w surowicy oraz adekwatnością hemodializy wyrażoną współczynnikiem Kt/V. Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej albuminie a czasem trwania terapii hemodializami, jednakże po ponownym oznaczeniu poziomu przeciwciał po 6 miesiącach nie stwierdzono tej korelacji. Nie wykazano związku pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej hemoglobinie a czasem trwania leczenia hemodializami. U pacjentów leczonych przewlekle hemodializami wykazano silną korelację pomiędzy poziomem tHcy a poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej albuminie oraz hemoglobinie. Nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniem kwasu foliowego w surowicy a poziomem obu przeciwciał w grupie badanej podczas gdy w grupie kontrolnej wykazano takie korelacje. Stwierdzono, że u pacjentów leczonych hemodializami obciążonych chorobą wieńcową oba przeciwciała występują w znamienne wyższym poziomie niż u osób bez choroby wieńcowej.

Badanie to pozostawiło wiele otwartych kwestii, między innymi nie wyjaśniono ostatecznie związku pomiędzy poziomem przeciwciał a czasem trwania leczenia nerkozastępczego oraz zależności pomiędzy występowaniem choroby wieńcowej a reakcją autoimmunologiczną związaną z homocysteinylacją białek. W badaniu tym nie analizowano również związku pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanym białkom a nasileniem stresu oksydacyjnego.

3. Założenia i cele pracy

Rola reakcji immunologicznych związanych z hiperhomocysteinemią w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek pozostaje niejasna. Wykazano, że w tej chorobie powstają Nε-Hcy-białka, które stanowią autoantygeny stymulujące humoralną odpowiedź immunologiczną. Stwierdzono występowanie przeciwciał przeciwko N-homocysteinylowanym białkom u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych przewlekle hemodializami. Dotychczas nie ustalono, jakie czynniki warunkują ich miano. Znaczenie kliniczne obecności tych przeciwciał w schyłkowej niewydolności nerek pozostaje nieznane, w tym ich ewentualny związek z ryzykiem występowania incydentów sercowo-naczyniowych.

Cele niniejszego badania były następujące:

1. Scharakteryzowanie czynników warunkujących miano przeciwciał przeciwko N-homocysteinylowanej albuminie i hemoglobinie u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych przewlekle hemodializami.
2. Ocena zależności pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko N-homocysteinylowanym białkom a występowaniem epizodów sercowo-naczyniowych u chorych leczonych przewlekle dializami.

4. Badani

4.1. Grupa badana

Do badania zakwalifikowano 247 chorych, 110 kobiet i 137 mężczyzn w wieku od 23 do 89 lat. Wszyscy pacjenci byli poddawani zabiegowi hemodializy minimum trzy razy w tygodniu, z użyciem nie reutilizowanych dializatorów polisulfonowych.

Pacjenci rekrutowani do badania objęci byli stałą opieką następujących ośrodków:

- Stacja Dializ Niepublicznego Specjalistycznego Zespołu Opieki Zdrowotnej AVITUM w Miechowie.
- Stacja Dializ Niepublicznego Specjalistycznego Zespołu Opieki Zdrowotnej AVITUM w Zgierzu.
- Stacja Dializ Niepublicznego Specjalistycznego Zespołu Opieki Zdrowotnej AVITUM w Łodzi.
- Stacja Hemodializ Kliniki Nefrologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.
- Stacja Dializ Kliniki Nefrologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.
- Stacja Dializ Samodzielnego Publicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej w Działdowie.

Kryteria włączenia do badania

Do badania kwalifikowani byli chorzy ze schyłkową niewydolnością nerek, leczeni przewlekłe hemodializami przez co najmniej 3 miesiące.

Przyjęto następujące kryteria wykluczające:

- cechy ostrej infekcji
- rozpoznany nowotwór złośliwy
- niedoczynność lub nadczynność tarczycy
- ostry incydent sercowo-naczyniowy w ostatnich 3 miesiącach przed włączeniem do badania

Wszystkie osoby wyraziły świadomą zgodę na udział w przedstawianym projekcie badawczym, który uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Krakowie (nr 24/KBL/OIL/2007).

4.2. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło 60 osób z populacji ogólnej dobranych pod względem płci i wieku oraz czynników ryzyka sercowo-naczyniowego. Stężenie kreatyniny $<140 \mu\text{mol/l}$ było warunkiem włączenia do grupy kontrolnej. Osoby do grupy kontrolnej rekrutowano spośród personelu Instytutu Kardiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie i ich rodzin.

W grupie kontrolnej 22 osoby były leczone z powodu nadciśnienia tętniczego, 23 z powodu choroby niedokrwiennej serca, 7 osób przeżyło w przeszłości udar mózgu. U 5 osób rozpoznano uprzednio cukrzycę. U wszystkich osób w grupie kontrolnej stwierdzono prawidłową bądź co najwyżej nieznacznie upośledzoną czynność nerek, ocenianą na podstawie wartości GFR obliczonej według skróconej formuły MDRD (16).

5. Metody

5.1. Badanie kliniczne

U wszystkich badanych osób przeprowadzono badanie podmiotowe i przedmiotowe a następnie pobrano krew do oznaczeń laboratoryjnych. W wywiadzie zbieranym od osób zakwalifikowanych do grupy badanej zwrócono szczególną uwagę na rozpoznanie choroby nerek, która doprowadziła do ich schyłkowej niewydolności, choroby współistniejące (przede wszystkim cukrzycę i choroby układu sercowo-naczyniowego) oraz na stosowane leki.

5.2. Badania podstawowe

W celu wykonania podstawowych oznaczeń laboratoryjnych u wszystkich pacjentów biorących udział w badaniu pobrano krew żylną. U pacjentów leczonych dializami pobrano próbki krwi przed środkową dializą w tygodniu. Procedurę pobrania krwi wykonywano zgodnie ze standardami obowiązującymi w pracowniach ośrodków biorących udział w badaniu. Używano probówek z wersenianem sodowym, 3,2% cytrynianem sodowym, oraz pobierano krew na skrzep. Morfologię krwi oznaczano bezpośrednio po pobraniu. Pozostałe próbki krwi były poddawane odpowiednim procedurom w zależności od ich dalszego przeznaczenia. U wszystkich osób biorących udział w badaniu wykonano oznaczenia lipidogramu (cholesterolu całkowitego, frakcji HDL, LDL oraz triglicerydów), glukozy, kwasu moczowego, pełny proteinogram oraz oznaczono poziom białka C-reaktywnego.

5.3. Badania dodatkowe

U wszystkich osób badanych wykonano oznaczenia następujących parametrów:

- stężenie homocysteiny całkowitej w osoczu krwi,
- poziom 8-izo-PGF_{2α},
- stężenie kwasu foliowego w surowicy krwi,
- oznaczenie polimorfizmu C677T genu reduktazy metylenotetrahydrofolianu (MTHFR).

Próbki krwi zostały pobrane w ośrodkach biorących udział w badaniu i po wstępnym opracowaniu przesłane do laboratorium Instytutu Kardiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, gdzie wykonano badania zgodnie z przyjętą tam procedurą.

Homocysteina całkowita

Stężenie tHcy oznaczono w osoczu krwi pobranej na wersenian sodu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) (155,156). Zakres wartości prawidłowych w populacji Krakowa: tHcy <14,5 $\mu\text{mol/l}$.

8-izo-PGF_{2 α}

Stężenie 8-izo-PGF_{2 α} w osoczu oznaczono metodą immunoenzymatyczną (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI).

Kwas foliowy

Stężenie kwasu foliowego w surowicy krwi oznaczono metodą immunochemiczną, zakres wartości prawidłowych: 3-17 ng/ml.

Polimorfizm C677T genu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR)

Oznaczenie polimorfizmu C677T genu MTHFR wykonano metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR – *polimerase chain reaction*) w DNA pochodzącym z leukocytów krwi obwodowej. Badanie wykonano przy użyciu techniki typowania genowego TaqMan SNP i systemu ABI PRISM® 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Przeciwciała przeciwko N ϵ -homocysteinyłowanym białkom

Przeciwciała przeciwko N ϵ -homocysteinyłowanej ludzkiej albuminie i hemoglobinie zostały oznaczone metodą immunoenzymatyczną (ELISA), jak już opublikowano (151,152).

N ϵ -Hcy-albuminę przygotowano rozpuszczając ludzką albuminę (Sigma) (końcowe stężenie 10 mg/ml) w 0.1 molowym buforze fosforanowym (PBS), pH 7.4 z dodatkiem 0.2 milimolowego roztworu EDTA. pH 7.4. W celu uzyskania modyfikacji albuminy do wyżej opisanej mieszaniny dodano 0.2 milimolowy roztwór tiolaktanu homocysteiny (Sigma). Tak przygotowany roztwór inkubowano w temperaturze 37°C przez 16 godzin. Metoda przygotowania N ϵ -Hcy-hemoglobiny przedstawia się podobnie z tym, że w miejsce ludzkiej albuminy użyto ludzkiej hemoglobiny (Sigma). Mikro płytki ELISA o średniej sile wiązania (PoliSorb, NUNC) opłaszczano przygotowanym wcześniej 10 $\mu\text{l/ml}$ roztworem N ϵ -Hcy-albuminy lub hemoglobiny w 0.1 mol/l roztworze buforu węglanowego o pH 9.6. Opłaszczony płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 180 minut. Następnie płukano płytki trzykrotnie buforem fosforanowym (PBS) o pH 7.4 z 0.1% Tweenem 20 i blokowano poprzez dodanie 3% albuminy wołowej (Sigma) rozpuszczonej w PBS i pozostawiano pod przykryciem w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. Następnie po trzykrotnym wypłukaniu płytki roztworem PBS/Tween 20 do studzienek nakładano 100 μl dołek badanej surowicy, rozcieńczonej w stosunku 1:100 w 0.01 mol/l PBS i 1% roztworze

albuminy wołowej i inkubowano pod przykryciem przez 18 godzin w temperaturze 4 °C. Po kolejnym płukaniu płytek roztworem PBS/Tween 20 do studzienek nakładano po 100 µl roztworu kozich przeciwciał przeciwko ludzkim immunoglobulinom G sprzężonych z peroksydazą chrzanową (Sigma), rozcieńczonych w roztworze PBS w stosunku 1: 10 000. Płytki pozostawiono pod przykryciem w temperaturze 37°C na 60 minut. Po ostatnim płukaniu płytek nakładano 100 µl/dolek roztworu o-fenylendiaminy (Sigma) z nadtlaniem wodoru (Sigma) rozpuszczone w buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,0. Reakcję barwną hamowano po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej poprzez dodanie 2 mol/l kwasu siarkowego. Absorbancję mierzono przy użyciu czytnika ELx808 (Biokom) przy długości fali 492 nm. Na każdej mikroplątce znajdowały się studzienki opłaszczane jedynie buforem węglanowym, stanowiące tzw. „tło” mikroplątki, oraz studzienki opłaszczane 10 mg/ml roztworem ludzkiej albuminy lub hemoglobiny niemodyfikowanej tiolaktonem homocysteiny, w celu wykluczenia nieswoistego wiązania przeciwciał IgG z niemodyfikowaną albuminą lub hemoglobiną. Od otrzymanych wartości absorbancji odczytanych ze studzienek opłaszczonych Nε-Hcy-albuminą lub hemoglobiną odejmowano wartość tła mikroplątki.

Surowica każdej z badanych osób była analizowana czterokrotnie. Wykonano po dwa oznaczenia na dwóch różnych mikroplątkach. Końcowy wynik był średnią arytmetyczną czterech wykonanych pomiarów. Dla wybranych losowo surowic wykonano próby rozcieńczeniowe według procedury podobnej dla oznaczania przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-białkom, dodając badane surowice w rosnących rozcieńczeniach. Zaobserwowano malejący poziom przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-białkom w kolejnych rozcieńczeniach. Dla potwierdzenia swoistości badanych przeciwciał wykonano testy kompetycyjne z użyciem trzech form ludzkiej albuminy i hemoglobiny: formy natywnej, zmodyfikowanej tiolaktonem homocysteiny oraz formy zmodyfikowanej tiolaktonem homocysteiny poddanej działaniu 10 mmol/l roztworu jodoacetamidu, który blokuje grupy tiolowe. Stwierdzono, że tylko Nε-Hcy-albumina i Nε-Hcy-hemoglobina były efektywnymi kompetitorami.

5.4. Odległa obserwacja kliniczna

Grupę badaną poddano obserwacji pod kątem wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych takich jak: świeży zawał serca, niestabilna choroba wieńcowa, nagły zgon sercowy, udar mózgu, epizod zatorowo-zakrzepowy. Rejestrowano również liczbę zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych oraz zgonów niezależnie od przyczyny. Potwierdzeniem wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego był odpowiedni wpis do dokumentacji chorego z rozpoznaniem epizodu według aktualnie obowiązujących kryteriów.

5.5. Analiza statystyczna

Zgodność rozkładu danych z rozkładem normalnym badano testem W Shapiro – Wilka. Wyniki przyjmujące rozkład normalny przedstawiono jako wartość średnią (\bar{x}) \pm odchylenie standardowe (SD). Parametry, których rozkład nie spełniał warunków normalności podano jako wartość mediany i przedziałów międzykwartylowych (IQR). Zmienność statystyczną różnic między grupami oceniano testem t Studenta lub jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA) dla wartości ciągłych o rozkładzie normalnym lub testem Mann – Whitney'a i testem rang Kruskala – Wallisa dla zmiennych niezgodnych z rozkładem normalnym. Do oceny międzygrupowych różnic dla zmiennych skategoryzowanych użyto testu χ^2 , natomiast w przypadku kiedy nie zostały spełnione założenia tego testu (wartości oczekiwane <5), do porównań wykorzystano test dokładny Fishera (157) Do oceny zgodności z równowagą Hardy'ego – Weinberga stosowano test χ^2 . Do oceny korelacji między zmiennymi użyto testu Pearsona lub Spearmana odpowiednio dla wartości przyjmujących rozkład normalny i dla danych niespełniających kryteriów normalności. Dla określenia czynników niezależnie wpływających na stężenie przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej albuminie lub hemoglobinie użyto modelu jedno i wieloczynnikowej regresji liniowej. Istotność wpływu poszczególnych czynników na zmienność stężenia przeciwciał testowano za pomocą regresji krokowej postępującej, pozostawiając w modelu te zmienne, dla których poziom istotności był równy lub mniejszy od 0,05. Wiek włączono do modelu regresji jako zmienną standaryzującą. Analizę normalności rozkładu reszt przeprowadzono testem W Shapiro – Wilka a analizę ich homoscedastyczności testem Szroetera z poprawką Sidaka. W modelu końcowym opisującym zmienność poziomu przeciwciał pozostawiono wytypowane w regresji krokowej zmienne zależne skorelowane wzajemnie ($r > 0,5$) pod warunkiem, że ich włączenie do modelu regresji nie spowodowało zaburzenia poziomu istotności statystycznej ani dla całego modelu, ani dla pozostałych zmiennych modelu (158,159). Dla

określenia czynników warunkujących wystąpienie incydentu sercowo-naczyniowego wykorzystano model wieloczynnikowej regresji logistycznej (160). Dla wszystkich analiz przyjęto jako znamiennej poziom istotności statystycznej równy bądź mniejszy od 0,05.

Obliczenia statystyczne wykonano programem Stata v. 10.0 (StataCorp), natomiast wykresy opracowano w programie Statistica 7.

6. Wyniki

6.1. Wyjściowa charakterystyka obu grup

Do badania zakwalifikowano 247 chorych ze schyłkową niewydolnością nerek, leczonych przewlekłe hemodializami, w wieku 23-89 lat (mediana; [IQR] 61; [51-70]). Mediana czasu leczenia nerkozastępczego przed rozpoczęciem badania wyniosła 37 miesięcy (zakres 18-71 miesięcy). Najliczniejszą grupę stanowili pacjenci z przewlekłym kłębuszkowym zapaleniem nerek (tabela 1).

Tabela 1. Przyczyna schyłkowej niewydolności nerek w grupie badanej (n =247).

Przyczyna schyłkowej niewydolności nerek	n (%)
przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek	57 (23)
przewlekła cewkowo-śródmiąższowa nefropatia bakteryjna	45 (18,2)
nefropatia cukrzycowa	45 (18,2)
zwyrodnienie wielotorbielowate nerek	22 (8,9)
nefropatia nadciśnieniowa	13 (5,3)
amyloidoza nerek	5 (2)
stan po obustronnym usunięciu nerek z powodu nowotworu	5 (2)
gruźlica nerek	2 (0,8)
przyczyna nieznana	53 (21,5)

Najczęściej występującą chorobą współistniejącą układu sercowo-naczyniowego było nadciśnienie tętnicze, które stwierdzono w chwili badania lub w przeszłości niemal u wszystkich osób badanych. Ponadto u co piątego chorego stwierdzono chorobę niedokrwienną serca w wywiadzie a 5,7% badanych przed zakwalifikowaniem do badania przebyło udar mózgu.

Najczęściej stosowanymi lekami w grupie badanej były ludzka rekombinowana erytropoetyna (r-huEPO), dożylnie preparaty żelaza oraz kwas foliowy w dawce 15mg/dobę. (Tabela 2).

Tabela 2. Leki stosowane przewlekłe w grupie badanej i kontrolnej.

Lek	Grupa badana n (%)	Grupa kontrolna n (%)	p
erytropoetyna	225 (91,1)	0	<0,0001
dożylnie preparaty żelaza	144 (58,3)	0	<0,0001
kwas foliowy	97 (39,3)	0	<0,0001
inhibitory ACE	112 (45,3)	22 (36,6)	0,25
statyny	61 (24,7)	29 (48,3)	0,0005
β-blokery	87 (35,2)	21 (35)	0,55
kwas acetylosalicylowy	52 (21,1)	30 (50)	<0,0001
acenokumarol	15 (6,1)	0	<0,0001

Grupa badana charakteryzowała się niższym poziomem hemoglobiny, płytek krwi, cholesterolu całkowitego oraz HDL i LDL-cholesterolu oraz wyższym poziomem triglicerydów niż grupa kontrolna. W grupie badanej zaobserwowano dwukrotnie wyższy poziom homocysteiny, 2,2-krotnie wyższy poziom kwasu foliowego, trzykrotnie wyższy poziom CRP i 3,3-krotnie wyższy poziom 8-izoprostanów w porównaniu z grupą kontrolną.

Tabela 3. Wyniki badań laboratoryjnych w grupie badanej w porównaniu grupą kontrolną.

Cecha	Grupa badana n = 247	Grupa kontrolna n = 60	p
Hemoglobina (g/dl)	11,2 (10,4-12,1)	13,8 (13,2-14,4)	<0,0001
Płytki krwi (x 10 ³ /μl)	197,5 (163-229)	222,5 (182-252,5)	0,008
Cholesterol całkowity (mmol/l)	4,46 (3,77-5,56)	5,02 (4,27-5,51)	0,05
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,06 (0,85-1,29)	1,25 (1,00-1,68)	<0,0001
LDL-cholesterol (mmol/l)	2,38 (1,81-3,35)	3,12 (2,2-3,46)	0,01
Triglicerydy (mmol/l)	1,83 (1,34-2,68)	1,16 (0,86-1,62)	<0,0001
Białko C-reaktywne (mg/l)	5,55 (2,21-11,48)	1,76 (0,8-2,9)	<0,001
tHcy (μmol/l)	21,5 (17,3-27,7)	10,7 (8,93-13,2)	<0,0001
Kwas foliowy (ng/l)	21,55 (14,6-27,8)	9,92 (7,74-15,1)	<0,0001
8-izo-PGF _{2α} (pg/ml)	301 (260-380)	90 (36,4-136)	0,0012
Kt/V*	1,34 (1,2-1,48)	-	
GFR (ml/min)**	-	84,3 ± 16,7	

* spKt/V wg Daugirdasa (161)

** wg skróconego wzoru MDRD (16)

Wyniki danych, których rozkład był zgodny z normalnym podano jako wartość średniej ± odchylenie standardowe, dla pozostałych parametrów podano wartość mediany i odstepu międzykwartylowego.

Ponadto w grupie hemodializowanej oznaczono proteinogram w surowicy: białko całkowite (69 g/l; [65-71]), albuminy (41 g/l; [38,7-44]), α₁-globuliny (2,8 g/l; [2,3-3,4]), α₂-globuliny (9,09 ± 2,46 g/l), β-globuliny (8,74 g/l; [7,0-10,4]), γ-globuliny (14,0 ± 3,96 g/l), a także poziom kwasu moczowego w surowicy (5,89 ± 1,34 mg/dl) i poziom parathormonu (348 pg/ml; [133,2-707,2]).

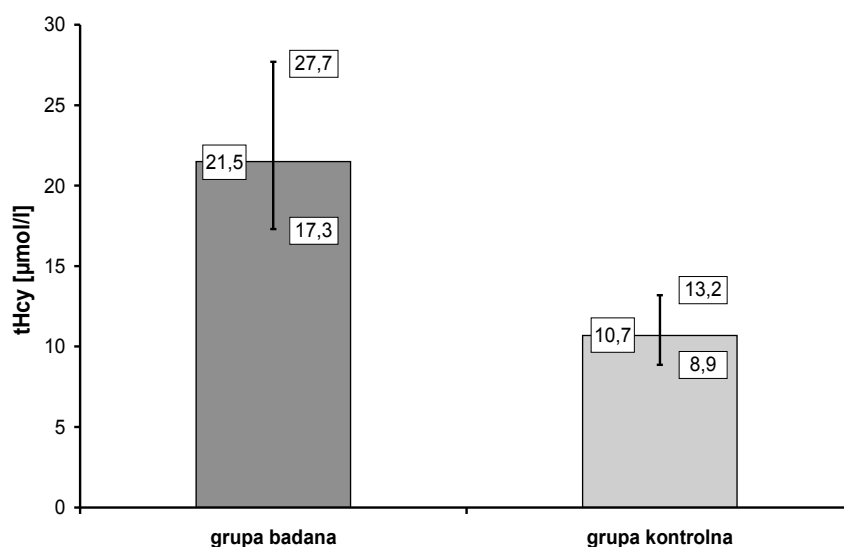
U 163 osób w grupie badanej oraz w całej grupie kontrolnej oznaczono polimorfizm C677T genu MTHFR. Rozkład genotypów w grupie badanej nie spełniał postulatu równowagi Hardy'ego – Weinberga. W porównaniu do grupy kontrolnej stwierdzono większą częstość wariantu TT – 26,4% (43 osoby) vs 8,3% (5 osób) (p = 0,003). Pozostałe warianty występowały odpowiednio w obu grupach u następującej liczby osób: CC – 33,7% (55) vs 56,7% (34) (p = 0,003), CT – 39,9% (65) vs 35% (21) (p = 0,53).

6.2. Poziom homocysteiny całkowitej.

W grupie badanej stwierdzono dwukrotnie wyższy poziom homocysteiny całkowitej w porównaniu do grupy kontrolnej. Częstość hiperhomocysteinemii (tHcy >14,5 $\mu\text{mol/l}$) w grupie badanej była ponad ośmiokrotnie większa niż w grupie kontrolnej (85,82% vs 10%, $p < 0,0001$).

U osób badanych z wariantem TT genu MTHFR stwierdzono istotnie wyższy poziom tHcy (32,8 $\mu\text{mol/l}$; [26,7- 40,1]) niż u nosicieli wariantu CC (16,4 $\mu\text{mol/l}$; [13,2- 18,5]) ($p < 0,0001$) i CT (21,4 $\mu\text{mol/l}$; [19,2- 24,6]) ($p < 0,0001$). Podobne zależności zaobserwowano w grupie kontrolnej.

Wykres 1. Poziom homocysteiny całkowitej w grupie badanej i kontrolnej (mediana, IQR).

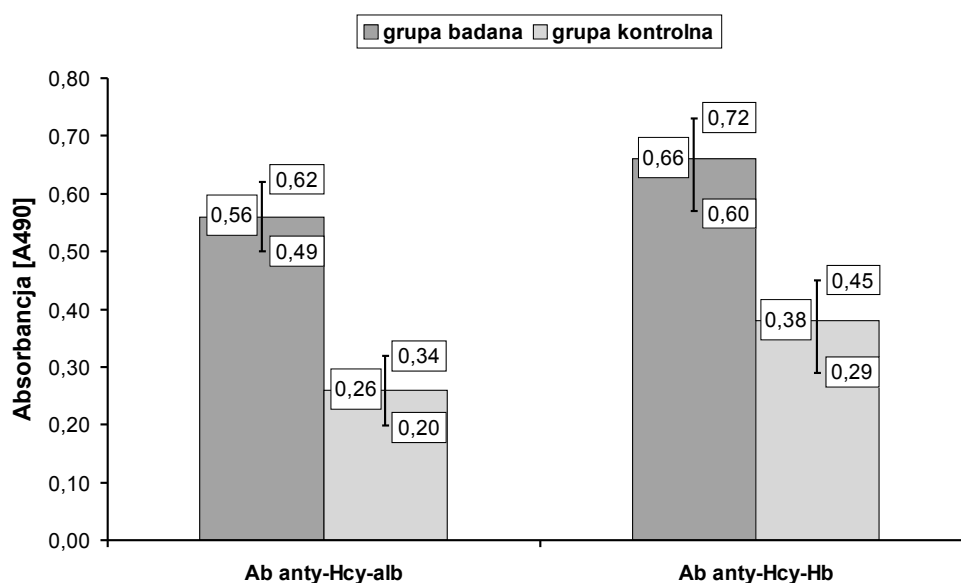


W grupie hemodializy odnotowano zależność pomiędzy poziomem tHcy a poziomem 8-izo-PGF_{2 α} ($r = 0,52$, $p < 0,0001$) oraz kwasu foliowego ($r = -0,53$, $p < 0,0001$). W grupie kontrolnej stwierdzono istotną korelację pomiędzy poziomem tHcy a 8-izo-PGF_{2 α} ($r = 0,64$, $p < 0,0001$).

6.3. Poziom przeciwciał przeciwko N ϵ -Hcy-albuminie oraz N ϵ -Hcy-hemoglobinie.

W grupie badanej stwierdzono dwukrotnie wyższy poziom przeciwciał przeciwko N ϵ -homocysteinylowanej albuminie ($p < 0,0001$) oraz 1,8-krotnie wyższy poziom przeciwciał przeciwko N ϵ -homocysteinylowanej hemoglobinie ($p < 0,0001$) w porównaniu do grupy kontrolnej (Wykres 2).

Wykres 2. Poziom przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanej albuminie i hemoglobinie w grupie badanej i kontrolnej.



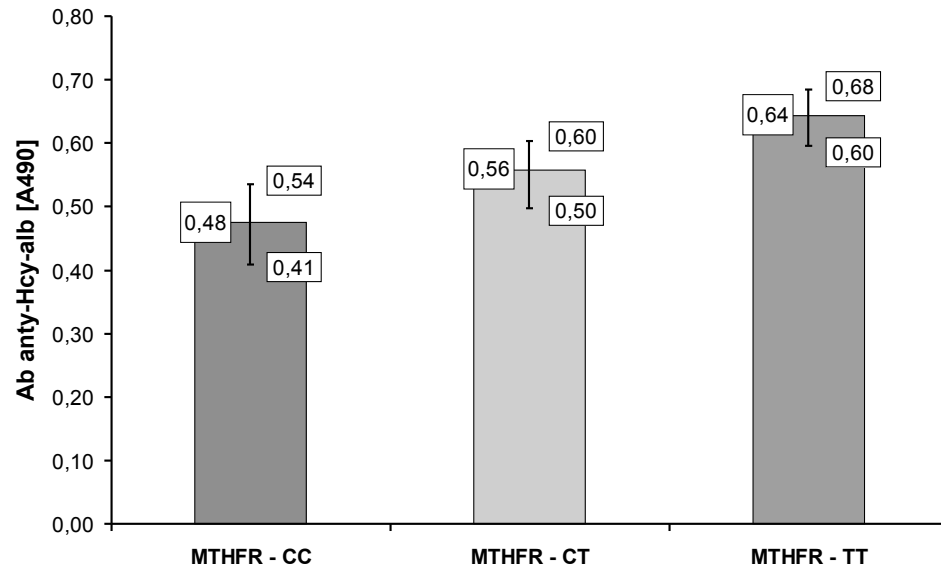
Seropozytywność, definiowaną jako poziom przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-albuminie powyżej 90 percentyla dla grupy kontrolnej, stwierdzono u 89,5% osób badanych ($p < 0,0001$), natomiast seropozytywność dla przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-hemoglobinie u 82,6% badanych ($p < 0,0001$).

Nie zaobserwowano istotnych zależności pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanym białkom a wiekiem, płcią ani pierwotną przyczyną schyłkowej niewydolności nerek.

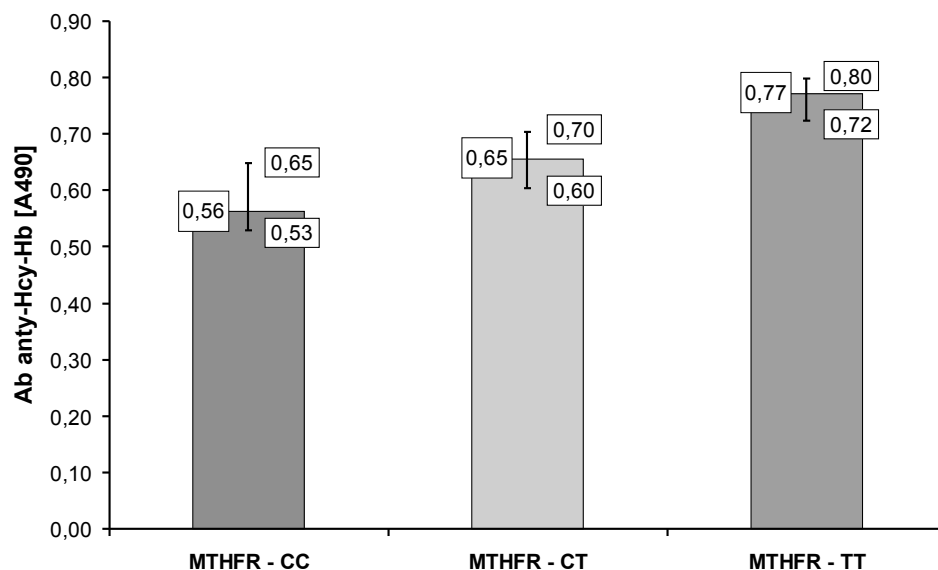
W grupie badanej zaobserwowano istotną, dodatnią korelację pomiędzy poziomem tHcy a poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanej albuminie ($r = 0,56$, $p < 0,0001$) oraz Nε-homocysteinyłowanej hemoglobinie ($r = 0,67$, $p < 0,0001$). Podobne zależności odnotowano w grupie kontrolnej (odpowiednio $r = 0,64$, $p < 0,0001$ i $r = 0,66$, $p < 0,0001$).

W grupie badanej poziom przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanym białkom był istotnie wyższy u chorych z wariantem TT genu C677T MTHFR niż u osób z pozostałymi genotypami (wykres 4 i 5).

Wykres 3. Poziom przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanej albuminie w zależności od wariantu genu MTHFR – grupa badana.

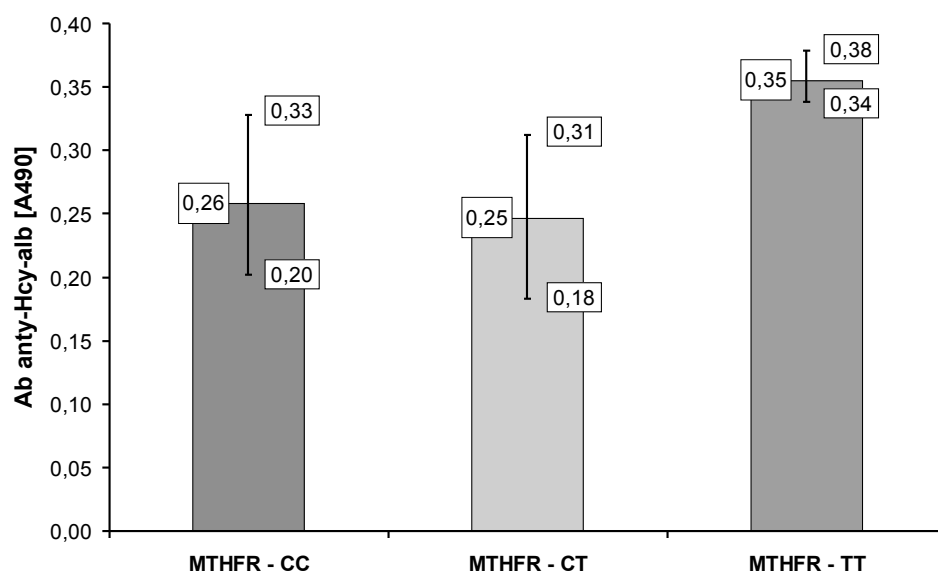


Wykres 4. Poziom przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej hemoglobinie w zależności od wariantu genu MTHFR – grupa badana.

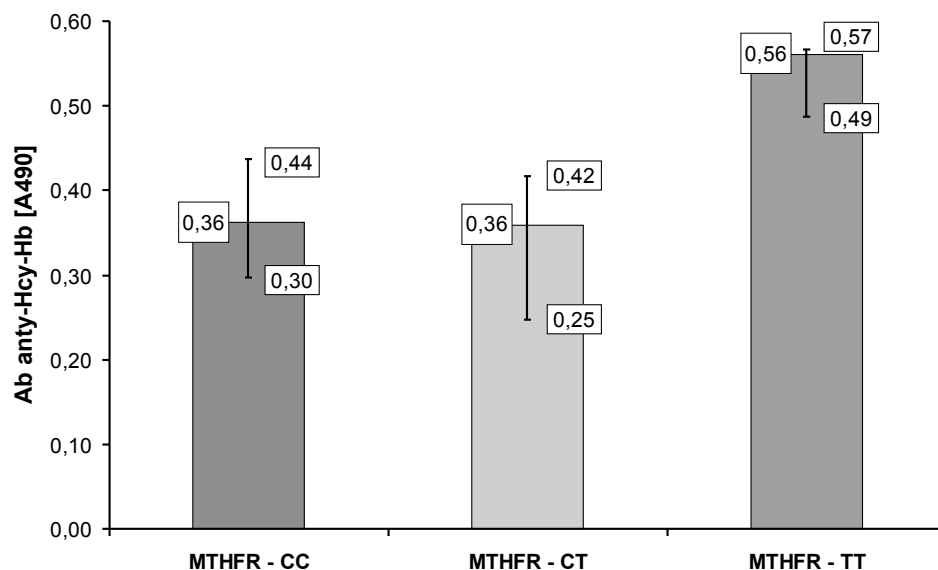


W grupie kontrolnej osoby z wariantem TT genu MTHFR charakteryzowały się znacząco wyższym poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanej albuminie i Nε-homocysteinyłowanej hemoglobinie niż osoby z allelami CC i CT, natomiast różnice pomiędzy osobami z wariantami CC i CT nie różniły się istotnie.

Wykres 5. Poziom przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanej albuminie w zależności od wariantu genu MTHFR – grupa kontrolna.

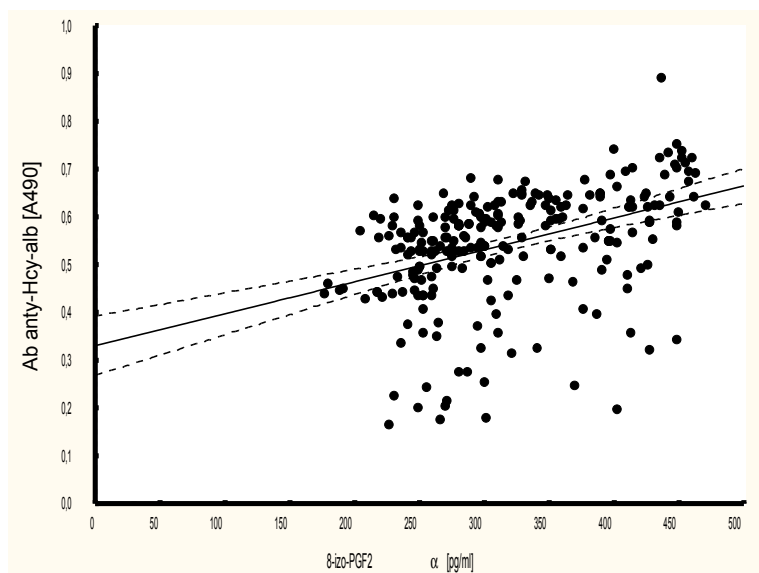


Wykres 6. Poziom przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanej hemoglobinie w zależności od wariantu genu MTHFR – grupa kontrolna.

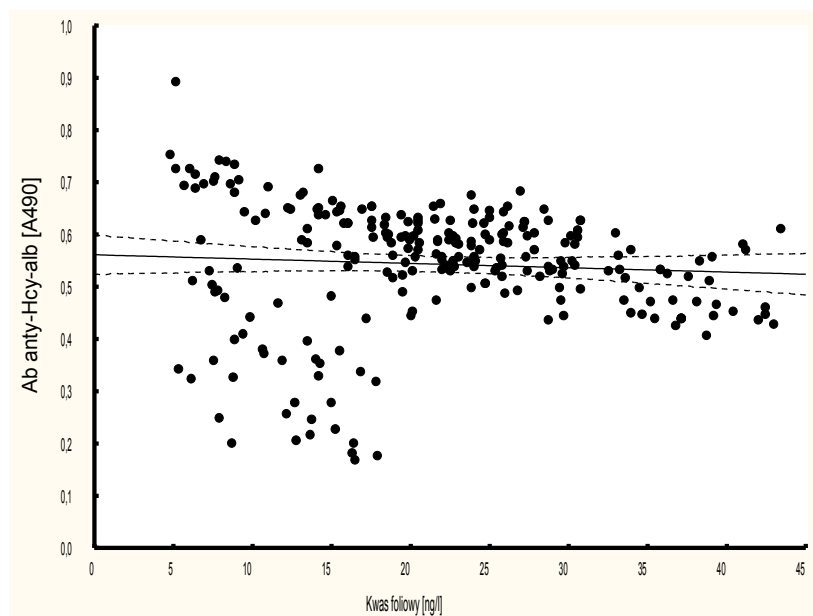


W grupie badanej odnotowano korelacje pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej albuminie a poziomem 8-izo-PGF_{2α} ($r=0,48$, $p<0,001$), kwasu foliowego ($r=-0,18$, $p=0,0054$) i parathormonu ($r=0,17$, $p=0,0083$). Nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem przeciwciał a poziomem hemoglobiny, liczbą płytek krwi, poziomem lipidów oraz białka C-reaktywnego.

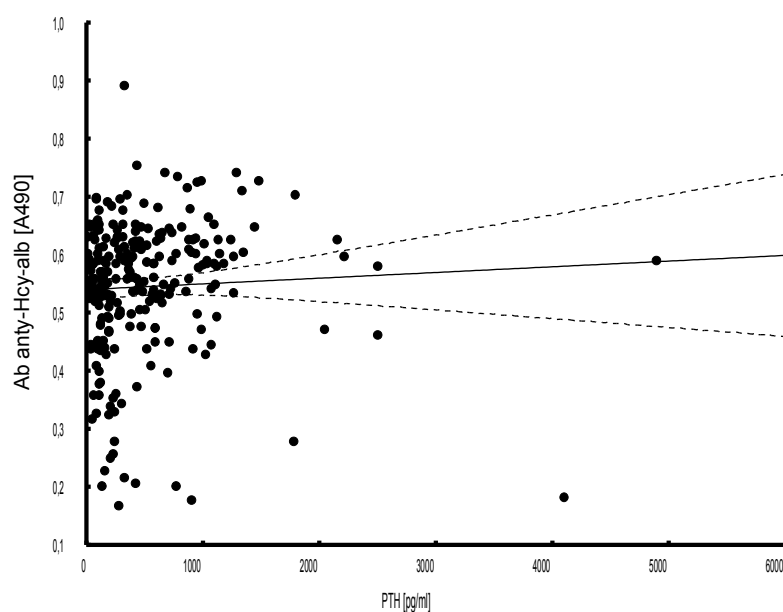
Wykres 7. Korelacja pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej albuminie a poziomem 8-izo-PGF_{2α} – grupa badana.



Wykres 8. Korelacja pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej albuminie a poziomem kwasu foliowego – grupa badana.

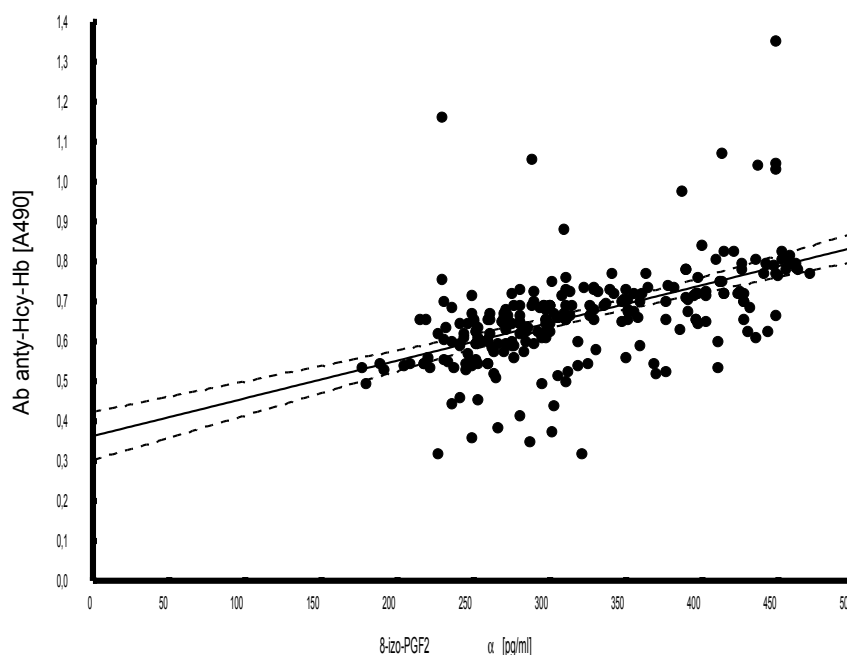


Wykres 9. Korelacja pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej albuminie a poziomem parathormonu – grupa badana.

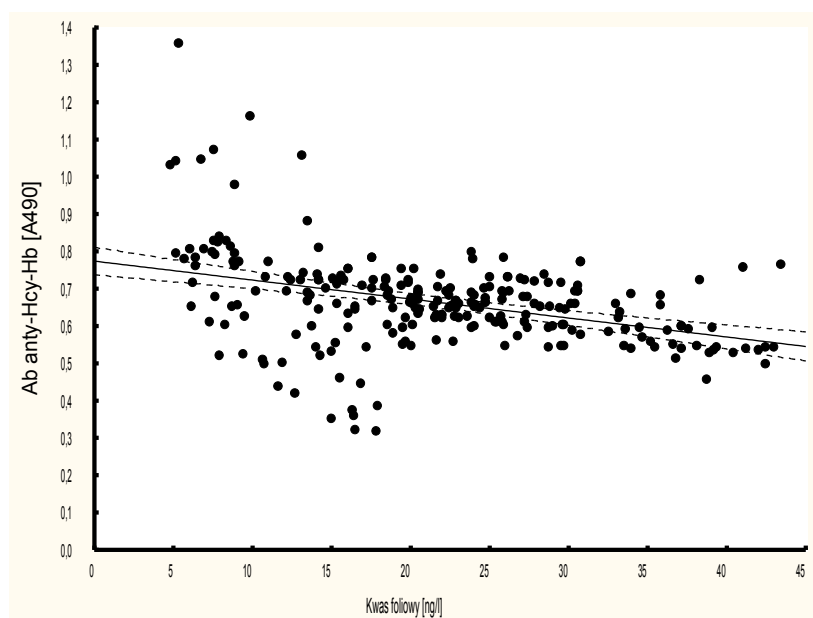


W grupie badanej odnotowano korelacje pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej hemoglobinie a poziomem 8-izo-PGF_{2α} ($r = 0,63$, $p < 0,0001$) oraz kwasu foliowego ($r = -0,38$, $p < 0,0001$).

Wykres 10. Korelacja pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko N ϵ -homocysteinylowanej hemoglobinie a poziomem 8-izo-PGF_{2 α} – grupa badana.



Wykres 11. Korelacja pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko N ϵ -homocysteinylowanej hemoglobinie a poziomem kwasu foliowego – grupa badana.



W grupie kontrolnej zaobserwowano korelacje pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko N-homocysteinylowanej albuminie a poziomem 8-izo-PGF_{2 α} ($r=0,32$, $p<0,0001$), kwasu foliowego ($r=0,33$, $p=0,01$) oraz CRP ($r=0,41$, $p=0,0012$). Stwierdzono również korelacje pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko N-homocysteinylowanej

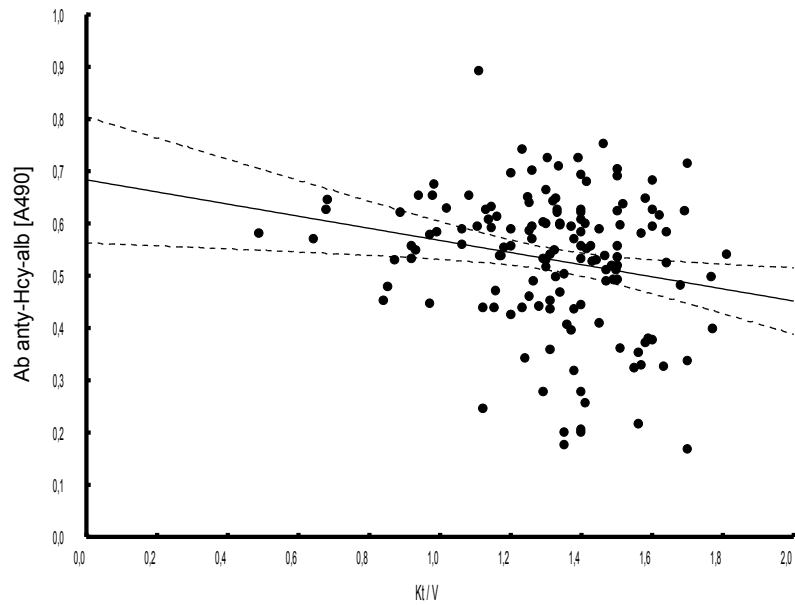
hemoglobinie a poziomem 8-izo-PGF_{2α} (r =0,24, p <0,0001), kwasu foliowego (r =0,36, p =0,0046) oraz CRP (r =0,37, p =0,0039). Nie zaobserwowano zależności pomiędzy poziomami badanych przeciwciał a wartością GFR.

Odnotowano istotnie niższy poziom przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej albuminie u tych osób w grupie badanej, które deklarowały stosowanie doustnej suplementacji kwasu foliowego w porównaniu do osób, które go nie przyjmowały (absorbancja A490 0,530; [0,408-0,615] vs 0,559; [0,515-0,625], p =0,002), przy czym nie stwierdzono w tych podgrupach istotnej różnicy w poziomach tHcy (21,59 μmol/l; [18,16-26,6] vs 20,97; [17,45-26,4], p =0,979) a poziom folianów był wyższy w tej drugiej grupie (19,7ng/l; [12,4-27,1] vs 22,95; [16,12-30,67], p =0,018).

Nie zaobserwowano innych zależności pomiędzy poziomem badanych przeciwciał a przyjmowanymi lekami.

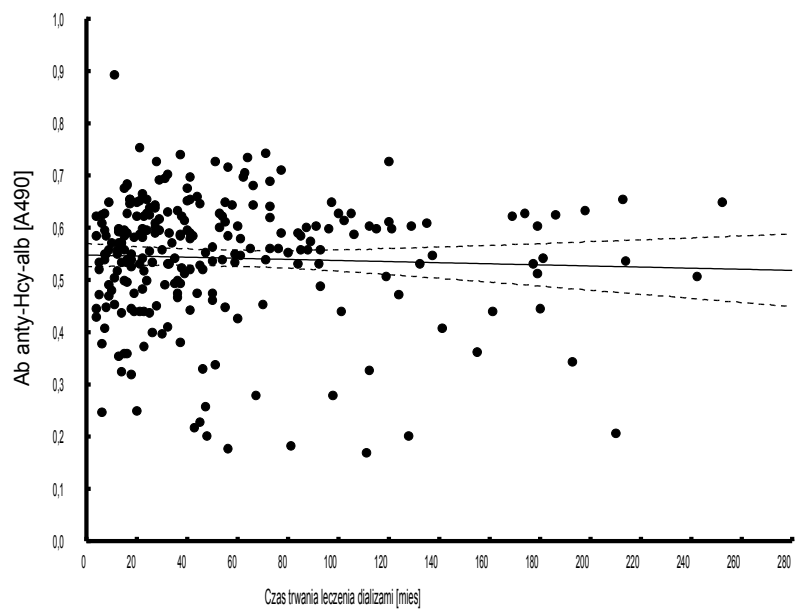
W grupie badanej odnotowano słabą ujemną korelację pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej albuminie a adekwatnością dializy wyrażoną współczynnikiem Kt/V (r =-0,18, p =0,0303). Nie odnotowano podobnej zależności w odniesieniu do przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej hemoglobinie (r =-0,06, p =0,43).

Wykres 12. Korelacja pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej albuminie a adekwatnością dializy.

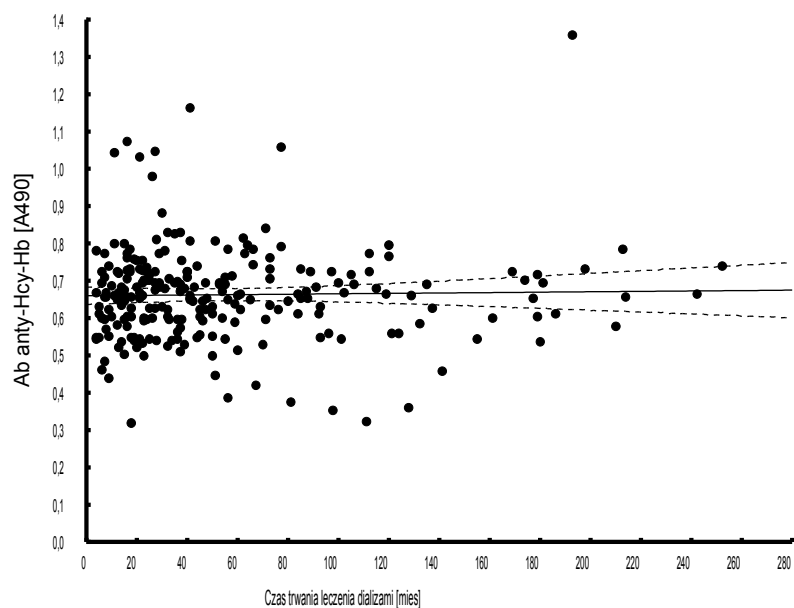


Nie odnotowano zależności pomiędzy poziomem przeciwciał a czasem trwania terapii nerkozastępczej.

Wykres 13. Zależność pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej albuminie a czasem trwania terapii nerkozastępczej.



Wykres 14. Zależność pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej hemoglobinie a czasem trwania terapii nerkozastępczej.



Osoby z dodatnim wywiadem w kierunku choroby wieńcowej ($n=48$) nie wykazywały istotnych różnic w poziomie przeciwciał przeciwko N ϵ -homocysteinyłowanej albuminie ani hemoglobinie w porównaniu do osób bez obciążenia tą chorobą (odpowiednio absorbancja A490 0,55; [0,495-0,599] vs 0,56; [0,451-0,618], $p=0,93$ i 0,656; [0,602-0,73] vs 0,655; [0,573-0,717], $p=0,47$).

Nie stwierdzono również różnic pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko N ϵ -homocysteinyłowanej albuminie ani hemoglobinie u osób z wywiadem udaru mózgu ($n=15$) w porównaniu do osób wolnych od tego obciążenia (odpowiednio absorbancja A490 0,559; [0,446-0,609] vs 0,558; [0,471-0,614], $p=0,83$ i 0,649; [0,563-0,707] vs 0,657 [0,594-0,722], $p=0,79$).

6.4. Czynniki wpływające na poziom przeciwciał przeciwko N ϵ -homocysteinyłowanym białkom.

Stosując model regresji liniowej jednoczynnikowej stwierdzono, że czynnikami istotnie wpływającymi na poziom przeciwciał przeciwko N ϵ -Hcy-albuminie w grupie badanej są: poziom tHcy i 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ (Tabela 4).

Tabela 4. Wyniki regresji liniowej jednoczynnikowej dla przeciwciał przeciwko N ϵ -Hcy-albuminie w grupie badanej ($n=247$).

	r	współczynnik	95%	p
--	----------	---------------------	------------	----------

			przedział ufności	
wiek	-0,004	-0,001	-0,001-0,0001	0,81
czas leczenia	-0,002	-0,0001	-0,0004-0,0002	0,49
HD				
tHcy	0,23	0,005	0,004-0,007	<0,0001
8-izo-PGF _{2α}	0,16	0,0007	0,0005-0,0008	<0,0001
kwask foliowy	0,0002	-0,0008	-0,002-0,0008	0,3
Hb	0,003	0,007	-0,004-0,019	0,19
płytki krwi	-0,004	-0,0004	-0,0003-0,0002	0,71
Kt/V	0,01	-0,57	-0,128-0,125	0,11
Cholesterol	0,01	0,011	-0,0007-0,0228	0,06
całk.				
HDL- cholesterol	0,007	-0,033	-0,074-0,007	0,1
LDL- cholesterol	0,03	0,018	0,005-0,032	0,007
triglicerydy	-0,004	0,0006	-0,009-0,11	0,9
CRP	0,01	-0,001	-0,002-0,0001	0,07
PTH	-0,002	0,00001	-0,00001- 0,0003	0,45
Albuminy	0,001	-0,002	-0,005-0,001	0,24

Stosując model wieloczynnikowej regresji liniowej stwierdzono, że czynnikami wpływającymi na poziom przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanej albuminie w grupie badanej są: poziom tHcy, kwasu foliowego oraz 8-izo-PGF_{2α} (tabela 5).

Tabela 5. Wyniki regresji liniowej wieloczynnikowej dla przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-albuminie w grupie badanej (n=247).

	Współczynnik [95% przedział ufności]	Udział w zmienności (%)	p
Model		35	<0,0001
Wiek	0,0003 [-0,0006-0,0012]	0,1	0,58
tHcy	0,006 [0,004-0,007]	23,8	<0,0001
kwask foliowy	0,004 [0,003-0,006]	5,2	<0,0001
8-izo-PGF _{2α}	0,0005 [0,0003-0,0007]	5,9	<0,0001

Ze względu na silną korelację pomiędzy poziomem tHcy a poziomem izoprostanów i kwasu foliowego należy przyjąć, że czynnikiem niezależnie warunkującym poziom przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-albuminie jest poziom tHcy.

Na podstawie regresji liniowej jednoczynnikowej stwierdzono, że na poziom przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-hemoglobinie w grupie badanej istotnie wpływają: poziom tHcy, 8-izo-PGF_{2α} oraz kwasu foliowego (tabela 6).

Tabela 6. Wyniki regresji liniowej jednoczynnikowej dla przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-hemoglobinie w grupie badanej (n=247).

	r	współczynnik	95% przedział ufności	p
wiek	-0,003	-0,0003	-0,0015-0,0001	0,64
czas leczenia HD	-0,004	0,0005	-0,0003-0,0004	0,74
tHcy	0,29	0,006	0,005-0,007	<0,0001
8-izo-PGF _{2α}	0,28	0,0009	0,0007-0,0011	<0,0001
Kt/V	-0,003	-0,3	-0,1-0,46	0,45
kwas foliowy	0,14	-0,005	-0,006- - 0,003	<0,0001
Hb	0,007	0,008	-0,004-0,202	0,19

płytki krwi	-0,004	0,0005	-0,0002-0,0003	0,68
Cholesterol całkow.	-0,003	0,003	-0,009-0,036	0,62
HDL-cholesterol	-0,004	-0,007	-0,05-0,36	0,76
LDL-cholesterol	-0,0005	0,007	-0,007-0,021	0,35
triglicerydy	-0,002	-0,004	-0,015-0,007	0,45
CRP	-0,002	-0,0004	-0,0015-0,0007	0,46
PTH	-0,003	0,00001	-0,00001- 0,0004	0,36
Albuminy	0,0006	0,002	-0,0016-0,0057	0,28

Stosując model wieloczynnikowej regresji liniowej stwierdzono, że czynnikami najsilniej wpływającymi na poziom przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-hemoglobinie w grupie badanej jest poziom tHcy oraz 8-izo-PGF_{2α} (tabela 7). Z uwagi na stwierdzoną korelację pomiędzy tHcy i 8-izo-PGF_{2α} interpretacja wyników regresji liniowej wieloczynnikowej powinna być najprawdopodobniej analogiczna do tej, którą przedstawiono w odniesieniu do przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-albuminie.

Tabela 7. Wyniki regresji liniowej wieloczynnikowej dla przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-hemoglobinie w grupie badanej (n=247).

	Współczynnik [95% przedział ufności]	Udział w zmienności (%)	p
Model		38,11	<0,0001
Wiek	0,0002 [-0,0007-0,0011]	0,05	0,66
tHcy	0,004 [0,003-0,005]	29,01	<0,0001
8-izo-PGF _{2α}	0,0006 [0,0004-0,0008]	9,05	<0,0001

6.5. Odległa obserwacja kliniczna.

Mediana czasu obserwacji wynosiła 24 miesiące (zakres 12-36 miesięcy). W tym czasie u 34 z 247 badanych osób odnotowano łącznie 47 incydentów sercowo-naczyniowych, w tym 7 świeżych zawałów serca, 6 przypadków niestabilnej choroby wieńcowej, 7 udarów mózgu, 5 nagłych zgonów sercowych, 16 zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych oraz 6 innych epizodów sercowo-naczyniowych. Z uwagi na stosunkowo niewielką liczebność podgrup chorych, u których w okresie obserwacji klinicznej odnotowano wystąpienie incydentu sercowo-naczyniowego, analizę statystyczną przeprowadzono łącznie dla wszystkich epizodów klinicznych.

Stwierdzono istotną różnicę wieku w podgrupie chorych, u których odnotowano wystąpienie incydentu klinicznego w porównaniu do podgrupy, u której nie wystąpił incydent (odpowiednio 65 lat; [55-71] vs 60; [49-70], p =0,0043). Nie zaobserwowano zależności pomiędzy wystąpieniem epizodu sercowo-naczyniowego a płcią chorych. Epizod sercowo-naczyniowy wystąpił częściej u chorych obciążonych chorobą wieńcową (OR = 3,778; 95% CI: 1,516-9,415; p =0,0063) oraz udarem mózgu (OR =6,609; 95% CI: 2,034-21,473; p =0,0035). Nie zaobserwowano istotnych korelacji pomiędzy wystąpieniem incydentu klinicznego a obecnością cukrzycy, jak również czasem leczenia dializami oraz adekwatnością dializy wyrażoną współczynnikiem Kt/V.

Epizod kliniczny wystąpił częściej u chorych stosujących przewlekle statyny (OR =3,037; 95% CI: 1,232-7,486; p =0,025), inhibitory konwertazy angiotensyny (OR =2,723; 95% CI: 1,222-6,068; p =0,013) oraz kwas acetylosalicylowy (OR =2,835; 95% CI: 1,125-7,147; p =0,035). Nie odnotowano zależności pomiędzy wystąpieniem epizodu sercowo-naczyniowego a przewlekłym stosowaniem innych leków, to jest: erytropoetyny, dożylnych preparatów żelaza, β-blokerów, α-blokerów, kwasu foliowego i acenokumarolu.

Nie stwierdzono związku pomiędzy wystąpieniem incydentu sercowo-naczyniowego a wynikami badań laboratoryjnych. Dokładne porównanie analizowanych parametrów przedstawiono w tabeli 8.

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wystąpieniem incydentu sercowo-naczyniowego a poziomem tHcy. Nie zaobserwowano także istotnej różnicy pomiędzy liczbą incydentów klinicznych, które wystąpiły w grupie chorych z hiperhomocysteinemią (tHcy >14,5 µmol/l) w porównaniu do liczby incydentów wśród osób z prawidłowym poziomem tHcy [30 (14,15%) vs 4(11,43%), p =0,66].

Przyjmując poziom przeciwciał przeciwko N-homocysteinyłowanym białkom jako zmienną o charakterze liniowym nie stwierdzono istotnych zależności pomiędzy wystąpieniem incydentu sercowo-naczyniowego a poziomem tychże przeciwciał. Po dokonaniu podziału badanych pod względem poziomu przeciwciał na kwartyle według rozkładu dla grupy kontrolnej stwierdzono, że zarówno większość osób u których odnotowano incydent sercowo- naczyniowy, jak i większość badanych, u których incydent nie wystąpił, znajdowała się w najwyższym kwartylu poziomu przeciwciał przeciwko N-Hcy-albuminie, jednak różnica pomiędzy odsetkami osób w obu grupach nie była istotna statystycznie (odpowiednio 88,2% i 93,4%, p =0,29). Po podziale kwartyłowym pod względem poziomu przeciwciał przeciwko N-homocysteinyłowane j albuminie oraz hemoglobinie według rozkładu dla grupy badanej nie stwierdzono istotnych zależności pomiędzy poziomem przeciwciał a wystąpieniem incydentu sercowo-naczyniowego.

Tabela 8. Wyniki badań laboratoryjnych w grupie, w której stwierdzono wystąpienie incydentu sercowo-naczyniowego (SN1) w porównaniu z grupą, w której incydent nie wystąpił (SN0).

Cecha	Grupa SN1 n = 34	Grupa SN0 n = 213	p
Hemoglobina (g/dl)	11,1 (0,5-12,1)	11,2 (10,4-12,3)	0,91
Płytki krwi (x 10 ³ / µl)	200 (155-229)	197 (164-229)	0,79
Glukoza (mmol/l)	5,9 (5,44-6,8)	5,55 (4,68-6,88)	0,42
Białko całkowite (g/l)	67,9 (65-71)	69 (65-71,3)	0,67
Albuminy (g/l)	40 (37,2-43,9)	41,3 (39,2-44)	0,63
Cholesterol całkowity (mmol/l)	4,54 (4,04-5,1)	4,46 (3,76-5,64)	0,55
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,01 (0,88-1,29)	1,06 (0,85-1,03)	0,91
LDL-cholesterol	2,6 (2,19-3,52)	2,4 (1,86-3,39)	0,26
Triglicerydy (mmol/l)	1,66 (1,15-2,02)	1,9 (1,38-2,96)	0,11
Białko C-reaktywne (mg/l)	7,32 (3,1-11,38)	5,21 (2,09-11,53)	0,2

Kwas moczowy ($\mu\text{mol/l}$)	342 (300,3-401,5)	349,1 (291,5-413,4)	0,58
Ferrytyna ($\mu\text{g/l}$)	534 (327,7-824)	554,7 (240,2-998,5)	0,66
Parathormon (pg/ml)	356 (118-638)	346 (133,5-714)	0,69
Kwas foliowy (ng/l)	20,5 (9,8-28,7)	21,6 (15,3-27,6)	0,45
8-izo-PGF _{2α} (pg/ml)	296 (252-336)	304 (260,5- 389)	0,25
Homocysteina ($\mu\text{mol/l}$)	21,15 (17,01-27,2)	21,5 (17,39-27,73)	0,82
Przeciwciała przeciwko N ϵ -homocysteinyłowanej albuminie (A490)	0,524 (0,442-0,580)	0,569 (0,497-0,632)	0,17
Przeciwciała przeciwko N ϵ -homocysteinyłowanej hemoglobinie (A490)	0,646 (0,558-0,732)	0,660 (0,597-0,723)	0,75

7. Omówienie

7.1. Poziom przeciwciał przeciwko N ϵ -homocysteinyłowanym białkom

W przedstawionej pracy wykazano, że poziom przeciwciał przeciwko N ϵ -homocysteinyłowanym białkom jest znamienne wyższy u osób z przewlekłą niewydolnością nerek leczonych hemodializami niż u osób ze stwierdzonymi czynnikami ryzyka sercowo- naczyniowego, ale z prawidłową lub umiarkowanie upośledzoną czynnością nerek. Spostrzeżenie to potwierdza i rozszerza dane wcześniej opublikowane (154), wskazujące, że poziom przeciwciał przeciwko N ϵ -homocysteinyłowanym białkom jest wyższy u pacjentów leczonych przewlekłe hemodializami w porównaniu do osób zdrowych. Stwierdzono, że obecność takich czynników ryzyka jak: cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, choroba wieńcowa czy zaburzenia gospodarki lipidowej, nie znosi działania zaawansowanej niewydolności nerek na autoimmunologiczny aspekt hiperhomocysteinemii w takiej populacji. Niewątpliwie hiperhomocysteinemia stosunkowo oporna na leczenie typowa dla ESRD jest wyjątkowo silnym czynnikiem stymulującym produkcję badanych autoprzeciwciał. Potwierdza to porównanie aktualnych wyników i tych z wcześniejszych badań. Zarówno poziom przeciwciał przeciwko N ϵ -homocysteinyłowanej albuminie jak i hemoglobinie był wyższy w grupie chorych ze schyłkową niewydolnością nerek niż u osób chorych na toczeń rumieniowaty układowy (153) i podobny jak u chorych z chorobą wieńcową (162). Należy jednakże wziąć pod uwagę przy porównaniach, że analizowane grupy różniły się liczebnością, wiekiem, płcią oraz obecnością czynników ryzyka sercowo-naczyniowego i chorobami współistniejącymi (cukrzyca, przewlekła choroba nerek). U pacjentów leczonych dializami stwierdzono ponad czterokrotnie częstsze występowanie hiperhomocysteinemii oraz prawie dwukrotnie

wyższą medianę poziomu tHcy niż u osób z toczniem rumieniowatym układowym. Średni poziom homocysteiny u chorych leczonych hemodializami był zbliżony do obserwowanego u chorych z chorobą wieńcową. U pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek odnotowano ponadto czterokrotnie wyższy średni poziom kwasu foliowego niż u chorych z toczniem i dwukrotnie wyższy niż u chorych z chorobą wieńcową, przy czym większość chorych dializowanych przyjmowała przewlekłe kwas foliowy.

7.2. Zależności pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanym białkom a innymi wynikami badań laboratoryjnych.

Podobnie jak we wcześniejszych doniesieniach (151-154), zgodnie z oczekiwaniami wykazano silną dodatnią korelację pomiędzy poziomem tHcy a poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanej albuminie i hemoglobinie. Siłę zależności pomiędzy poziomem tHcy i poziomem przeciwciał potwierdzają wyniki regresji, które wskazują, że tHcy jest niezależnym predyktorem poziomu badanych przeciwciał. Siła korelacji pomiędzy poziomem tHcy a poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanej albuminie była mniejsza od obserwowanej u pacjentów z chorobą wieńcową i toczniem rumieniowatym układowym, natomiast siła korelacji pomiędzy poziomem tHcy a poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanej hemoglobinie była zbliżona do wartości odnotowanej w tych grupach chorych. Odnotowano silniejszą korelację pomiędzy stężeniem tHcy a poziomem badanych przeciwciał niż u chorych po przebytych udarze mózgu (151). Te obserwacje stanowią dodatkowy argument potwierdzający pogląd, że uporczywa hiperhomocysteinemia w ESRD jest silnym bodźcem do produkcji takich przeciwciał.

Ważną i oryginalną obserwacją poczynioną w tym badaniu jest stwierdzona zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej, silna dodatnia korelacja pomiędzy poziomem 8-izo-PGF_{2α} a poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanym białkom we krwi. Analiza wyników regresji wieloczynnikowej wskazuje, że pomimo istnienia silnej korelacji pomiędzy poziomem 8-izo-PGF_{2α} a poziomem tHcy, wprowadzenie 8-izoprostanów do modelu regresji nie powoduje utraty znamienności statystycznej ani dla całego modelu, ani dla pozostałych zmiennych, a uwzględnienie poziomu 8-izoprostanu tłumaczy zmienność

poziomu przeciwciał w większym stopniu, niż należałoby tego oczekiwać wyłącznie na podstawie jego związku z poziomem tHcy. W dotychczas opublikowanych pracach nie badano korelacji pomiędzy nasileniem stresu oksydacyjnego a reakcją autoimmunologiczną prowadzącą do powstawania przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanym białkom.

Stres oksydacyjny jest, obok uznanych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, jednym z istotnych elementów patofizjologii miażdżycy (40,41,113). U pacjentów z przewlekłą chorobą nerek wykazano cechy nasilonego stresu oksydacyjnego, między innymi podwyższony poziom produktów oksydacji lipidów – F2-izoprostanów (163,164). W badaniu użyto poziomu 8-izo-PGF_{2α} jako dobrego, stabilnego markera stresu oksydacyjnego (42,44). We wcześniejszych badaniach wykorzystywano w tym celu inne substancje: malonyldialdehyd (MDA) i reaktywne produkty kwasu tiobarbiturowego (TBARS).

Związek przyczynowy pomiędzy stresem oksydacyjnym a ryzykiem sercowo-naczyniowym u chorych z CKD pozostaje niejasny (113). Rezultaty dotychczas prowadzonych badań wskazywały, że N-homocysteinyłacja białek i synteza autoprzeciwciał zachodzą niezależnie od nasilenia stresu oksydacyjnego, a obserwowane zaburzenia równowagi redox są konsekwencją zaburzenia czynności białek, głównie albumin i cytochromu c, spowodowanego ich homocysteinyłacją (147,148). Wyniki prezentowanej pracy mogą wskazywać, że nasilony stres oksydacyjny, najpewniej przez oksydację białek, modyfikuje homocysteinyłację białek, co pokazano dla albuminy (147), a w konsekwencji nasilenie procesów autoimmunologicznych i produkcję przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanym białkom. Elementem łączącym nasilony stres oksydacyjny ze zwiększoną N-homocysteinyłacją białek może być aktywność paraoksonazy 1 (PON1). PON1 jest enzymem katalizującym hydrolizę HCTL. Wykazano, że aktywność PON1 ujemnie koreluje z poziomem N-homocysteinyłowanych białek zarówno *in vitro* (165,166) jak i *in vivo* (167). Stwierdzono również, że aktywność PON1 wykazuje ujemną korelację z poziomem wskaźników nasilenia stresu oksydacyjnego takich jak produkty peroksydacji lipidów u chorych z kardiologicznym zespołem X (168) oraz z nasileniem zmian miażdżycowych w naczyniach wieńcowych u chorych z ostrymi zespołami wieńcowymi (169). W prezentowanej pracy nie badano aktywności PON1, niemniej wiadomo, że aktywność tego enzymu jest obniżona u chorych hemodializowanych (170).

W grupie badanej odnotowano umiarkowane, ujemne korelacje pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanym białkom a poziomem kwasu foliowego. W grupie tej wykazano silny związek pomiędzy poziomem kwasu foliowego a poziomem tHcy. Nie udało się wprawdzie udowodnić za pomocą regresji jednoczynnikowej liniowego związku pomiędzy poziomem kwasu foliowego a poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej albuminie, jednakże wynik regresji wieloczynnikowej wskazuje, że poziom kwasu foliowego, podobnie jak poziom 8-izo-PGF_{2α}, wpływa na poziom przeciwciał w sposób większy, niż wynikałoby to wyłącznie z jego korelacji z poziomem tHcy. Suplementacja kwasu foliowego u zdrowych osób prowadzi do obniżenia poziomu HCTL oraz przeciwciał przeciwko N-homocysteinylowanym białkom, natomiast u osób z chorobą wieńcową wykazano oporność na tą formę leczenia (162). Znaczenie suplementacji kwasu foliowego w redukcji poziomu tHcy i zmniejszeniu ryzyka sercowo-naczyniowego u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych dializami pozostaje niejasne a wyniki doniesień są rozbieżne (102-104,106). Perna i wsp. wykazali, że stosowanie kwasu foliowego powoduje obniżenie poziomu Nε-homocysteinylowanych białek u chorych hemodializowanych (171). W prezentowanym badaniu wykazano istotnie niższy poziom przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanej albuminie, ale nie przeciwciał przeciwko hemoglobinie u tych osób w grupie badanej, które otrzymywały doustnie kwas foliowy w porównaniu do osób, które go nie przyjmowały. Natomiast Undas i wsp. (154) nie wykazali zależności pomiędzy przyjmowaniem kwasu foliowego o poziomie przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinylowanym białkom u chorych dializowanych. W badaniu tym, podobnie jak w prezentowanej pracy, nie wykazano istotnych różnic pomiędzy poziomem tHcy u tych chorych, którzy stosowali regularnie kwas foliowy i tych, którzy go nie przyjmowali. Obserwacja ta może potwierdzać wcześniejszą hipotezę, że wtórna prewencja poprzez suplementację witamin biorących udział w metabolizmie homocysteiny jest nieskuteczna (140). Ponadto rozbieżności w wynikach mogą być spowodowane różnicą w częstości stosowania kwasu foliowego. W grupie badanej w niniejszej pracy stosowano go u dwukrotnie mniejszego odsetka chorych. Istotność tej zależności jest również ograniczona przez fakt, że suplementacja kwasu foliowego w niniejszym badaniu nie miała charakteru próby kontrolowanej a opierała się głównie na deklaracji jego uczestników. Stwierdzone niższe poziomy kwasu foliowego w surowicy u

osób deklarujących jego stosowanie w porównaniu do tych, które go nie przyjmowały wydają się potwierdzać te wątpliwości.

Kwas foliowy oprócz wpływu na metabolizm Hcy posiada właściwości antyoksydacyjne nie związane z obniżaniem poziomu tHcy. Wykazano, że dożylnie podanie aktywnej formy kwasu foliowego, 5-metylotetrahydrofolianu (5-MTHF) powoduje poprawę zależnej od śródbłonna, mediowanej przez NO reakcji wazomotorycznej u chorych z chorobą wieńcową poddawanych operacji pomostowania aortalno-wieńcowego (172). Leczenie małymi dawkami kwasu foliowego (400 µg/dobę) powoduje poprawę czynności śródbłonna naczyniowego zależnej od aktywności eNOS oraz zmniejszenie syntezy nadtlenków u pacjentów z chorobą wieńcową a zwiększenie dawki kwasu foliowego (do 5 mg/dobę) nie powoduje znaczącego nasilenia tych efektów (173). Kwas foliowy wykazuje również działanie antyoksydacyjne poprzez poprawę działania komórkowych systemów obrony przed reaktywnymi związkami tlenu (110). W niniejszej pracy stwierdzono istotną, negatywną korelację pomiędzy poziomem kwasu foliowego a poziomem 8-izo-PGF_{2α} u chorych hemodializowanych (dane nie pokazane). Wykazany w regresji związek pomiędzy poziomem kwasu foliowego i poziomem przeciwciał przeciwko N-homocysteinylowanej albuminie może po części wynikać z wpływu niedoboru folianów na nasilenie stresu oksydacyjnego.

Podobnie jak u chorych z chorobą wieńcową (162), w grupie chorych ze schyłkową niewydolnością nerek nie wykazano związku pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko N-homocysteinylowanym białkom a poziomem CRP. Obserwacja ta jest zgodna z wcześniejszym doniesieniem (154). Związek hiperhomocysteinemii z rozwojem reakcji zapalnej został wykazany w licznych pracach (125-129). Stwierdzono również, że podwyższony poziom CRP jest predyktorem śmiertelności u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek (174). Brak korelacji pomiędzy poziomem CRP a poziomem przeciwciał przeciwko homocysteinylowanym białkom oraz analiza wyników regresji mogą wskazywać, że u chorych hemodializowanych znaczenie kliniczne reakcji zapalnej w patogenezie zjawisk autoimmunologicznych ma mniejsze znaczenie niż u badanych dotychczas osób z innymi chorobami przewlekłymi, na przykład u chorych z toczniem układowym (153).

Zgodnie z oczekiwaniami u osób z wariantem TT genu MTHFR odnotowano istotnie wyższy poziom tHcy niż u nosicieli wariantów CC i CT, co potwierdza wyniki dotychczasowych obserwacji (93,94). U osób tych odnotowano również wyższy poziom

przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanym białkom. Najprawdopodobniej wynika to z istotnie wyższego poziomu tHcy u osób z genotypem TT.

Interesującą obserwacją jest stwierdzenie w grupie badanej wysoki odsetek (26,4%) osób z wariantem TT genu MTHFR. Dotychczasowe badania nie wskazywały bowiem, aby mutacja ta stanowiła czynnik predysponujący do wystąpienia schyłkowej niewydolności nerek (175-177).

7.3. Zależności pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanym białkom a danymi klinicznymi.

Nie wykazano zależności pomiędzy wiekiem i płcią badanych a poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanym białkom. Nie stwierdzono również zależności pomiędzy poziomem przeciwciał a pierwotną przyczyną choroby nerek oraz czasem trwania leczenia hemodializami. Nie potwierdziło to wcześniejszej obserwacji (154), że czas trwania leczenia nerkozastępczego koreluje z poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanej albuminie i hipotezy, według której przewlekłe leczenie hemodializami wpływa hamująco na reakcję autoimmunologiczną związaną z homocysteiną.

Nie stwierdzono również opisywanego uprzednio wyższego poziomu przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanym białkom u chorych hemodializowanych obciążonych chorobą wieńcową. Różnice pomiędzy wynikami prezentowanej pracy a wcześniejszym doniesieniem mogą wynikać z różnej liczebności badanych grup. Również chorzy z przebyłym udarem mózgu nie różnili się istotnie poziomem przeciwciał od osób, które nie przeżyły takiego epizodu.

Jedyną zależnością pomiędzy poziomem badanych przeciwciał a stosowanymi przewlekłe lekami był opisany powyżej istotnie niższy poziom przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanej albuminie u tych chorych, którzy przyjmowali przewlekłe kwas foliowy. Nie stwierdzono, aby inne leki wpływały na poziom przeciwciał, przy czym żaden z uczestników badania nie otrzymywał innych niż kwas foliowy leków, które mogłyby istotnie wpływać na poziom tHcy.

7.4. Obserwacja kliniczna

W celu oceny związku pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanym białkom a ryzykiem wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego

uczestników badania poddano obserwacji klinicznej. Mediana czasu obserwacji wynosiła 24 miesiące (zakres 12-36 miesięcy). W tym okresie u 34 z 247 badanych osób odnotowano łącznie 47 incydentów sercowo-naczyniowych.

Stwierdzono istotny związek pomiędzy wystąpieniem incydentu sercowo-naczyniowego a wiekiem pacjentów oraz obciążeniem chorobą wieńcową lub udarem mózgu. Nie stwierdzono związku pomiędzy wystąpieniem epizodu a płcią chorych. Na ryzyko wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego nie miały również wpływu takie czynniki jak: obecność cukrzycy, czas trwania leczenia nerkozastępczego oraz adekwatność dializ.

Stwierdzono, że epizody kliniczne wystąpiły częściej u tych chorych, którzy przyjmowali przewlekle kwas acetylosalicylowy, statyny i inhibitory konwertazy angiotensyny. Związek ten można wyjaśnić tak, że osoby stosujące te leki były prawdopodobnie bardziej obciążone czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego niż pacjenci, którzy ich nie otrzymywali.

Nie wykazano związku pomiędzy wystąpieniem incydentu klinicznego a wynikami badań laboratoryjnych, w tym parametrami mającymi u chorych leczonych hemodializami udowodniony związek z ryzykiem sercowo-naczyniowym: poziomem hemoglobiny, profilem lipidowym, poziomem albumin, CRP, ferrytyny oraz poziomem F₂-izoprostanów. Rezultaty powyższe, choć pozornie są sprzeczne z wynikami badań charakteryzujących czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego w populacji chorych ze schyłkową niewydolnością nerek, wynikają najprawdopodobniej z ograniczeń wynikających z przyjętych kryteriów włączenia do badania. Oznaczenia laboratoryjne wykonywane były u pacjentów w stabilnym okresie schyłkowej niewydolności nerek a choroby współistniejące, takie jak ostre stany zapalne czy trzymiesięczny okres po wystąpieniu ostrego incydentu sercowo-naczyniowego były kryteriami wyłączającymi z badania. W badaniu nie brali również udziału pacjenci z cechami niedożywienia (znaczną hipoalbuminemią), które u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek jest czynnikiem ryzyka sercowo-naczyniowego.

W prezentowanej pracy nie odnotowano związku pomiędzy wystąpieniem epizodu klinicznego a poziomem tHcy. Związek pomiędzy hiperhomocysteinemią a zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek jest nadal przedmiotem dyskusji, najpewniej wskutek obecności licznych czynników zakłócających o znanym silnym wpływie na rozwój miażdżycy i jej powikłań. Znane są doniesienia kwestionujące znaczenie hiperhomocystemii jako czynnika rokowniczego w tej populacji

chorych (74,76,77). Nie można jednakże wykluczyć, że w prezentowanej pracy brak związku pomiędzy hiperhomocysteinemią a wystąpieniem epizodu klinicznego jest, podobnie jak w przypadku innych analizowanych parametrów biochemicznych, rezultatem stosunkowo krótkiego czasu obserwacji. Podobnie nie wykazano związku pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko N ϵ -homocysteinylowanemu białkom a wystąpieniem incydentu sercowo-naczyniowego. Jednakże weryfikacja hipotezy, że reakcja autoimmunologiczna związana z powstawaniem tych przeciwciał odgrywa rolę w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek wymaga bez wątpienia przeprowadzenia dalszych badań na większej grupie chorych poddanych dłuższej obserwacji.

7.5. Ograniczenia badania

Przedstawione badanie nie jest wolne od ograniczeń. Jest to badanie kliniczno-kontrolne, a więc charakteryzujące się mniejszą wiarygodnością niż badania prospektywne. Szczególnie cenna byłaby długa obserwacja grupy pacjentów począwszy od czasu ustalenia rozpoznania CKD jeszcze przed leczeniem nerkozastępczym, choć z punktu widzenia logistyki takie badania byłyby trudne do przeprowadzenia. Kolejnym ograniczeniem badania jest stosunkowo niewielka liczebność zarówno grupy badanej, jak i kontrolnej oraz relatywnie krótki czas obserwacji klinicznej, co może skutkować stosunkowo niewielką liczbą odnotowanych incydentów klinicznych. Analizę oparto także na pojedynczym pomiarze parametrów laboratoryjnych, a wydaje się być prawdopodobnym, że wraz z upływem czasu produkcja przeciwciał oznaczanych w tym badaniu może ulec zmianie. Nie jest też jasne, czy podobne zależności i poziomy przeciwciał obserwuje się u pacjentów z CKD leczonych dializą otrzewnową. Szukając parametrów determinujących poziomy przeciwciał nie uwzględniono niektórych potencjalnie ważnych parametrów takich jak stężenie witaminy B12 i B6. Nie oznaczano również aktywności enzymów o działaniu antyoksydacyjnym, które także mogą wpływać na poziomy stres oksydacyjny i tłumaczyć obserwowane zależności między izoprostanami a badanymi przeciwciałami.

Ograniczeniem badania jest również przyjęty model analiz statystycznych. Obliczenia oparte na regresji liniowej z racji swoich założeń (rozkład zmiennych zgodny z normalnym, liniowa zależność pomiędzy zmiennymi) nie są doskonałą metodą oceny złożonego wpływu wielu czynników na określone zjawiska biologiczne. Jednakże uznano, że zastosowanie innych analiz biostatystycznych spowodowałoby, przy stosunkowo

niewielkiej liczebności grup i charakterze posiadanych danych, nadmierną komplikację modelu matematycznego nie prowadzącą do lepszego wyjaśnienia badanych zależności.

Podsumowując, przedstawione badanie poszerza wiedzę na temat związków między hiperhomocysteinemią i jej immunologicznymi konsekwencjami w populacji przewlekle hemodializowanych chorych. Wykazanie zależności ze stresem oksydacyjnym pokazuje potencjalne nowe mechanizmy determinujące nasilenie produkcji autoprzeciwciał związanych z dużym stężeniem homocysteiny u takich chorych.

8. Wnioski

1. U chorych ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych przewlekle hemodializami stwierdza się większe poziomy przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanej albuminie i hemoglobinie w surowicy w porównaniu z osobami dobranymi pod względem płci, wieku, czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, oraz z kreatyniną <140 μmol/l.
2. Poziom przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanej albuminie i hemoglobinie wykazywał dodatnią korelację z nasileniem stresu oksydacyjnego u chorych przewlekle hemodializowanych.
3. Czynniki istotnie wpływającymi na poziom przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-albuminie są: poziom tHcy i 8-izo-PGF_{2α}.
4. Czynniki istotnie wpływającymi na poziom przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-hemoglobinie są: poziom tHcy, 8-izo-PGF_{2α} oraz kwasu foliowego.
5. Poziom przeciwciał przeciwko Nε-homocysteinyłowanym białkom nie koreluje z czasem trwania hemodializoterapii, przyczyną choroby ani ryzykiem wystąpienia epizodu sercowo- naczyniowego w odległej obserwacji.

9. Streszczenie

Rola przeciwciał przeciwko N-homocysteinyłowanym białkom w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych przewlekłe hemodializami pozostaje niejasna. Dotychczas nie ustalono, jakie czynniki warunkują miano tych przeciwciał, ani jaki jest ich związek z ryzykiem występowania incydentów sercowo- naczyniowych. Celem niniejszego badania było scharakteryzowanie czynników warunkujących miano przeciwciał przeciwko N-homocysteinyłowanej albuminie i hemoglobinie u chorych leczonych przewlekłe hemodializami oraz ocena zależności pomiędzy poziomem badanych przeciwciał a występowaniem epizodów sercowo- naczyniowych u tych chorych.

W badaniu wzięło udział 247 chorych (110 kobiet) leczonych przewlekłe hemodializami (mediana czasu leczenia 37 miesięcy). Mediana wieku chorych wynosiła 61 lat. Grupę kontrolną stanowiło 60 osób z populacji ogólnej dobranych pod względem płci, wieku i czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, z poziomem kreatyniny w surowicy $<140 \mu\text{mol/l}$. Oznaczano stężenie całkowitej Hcy (tHcy) we krwi metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, kwas foliowy i 8-izoprostaglandynę $F_{2\alpha}$ (8-izo-PGF $_{2\alpha}$) metodami enzymatycznymi. Przeciwciała klasy IgG przeciwko Ne-Hcy-albuminie i hemoglobinie oznaczono metodą immunoenzymatyczną. Oznaczono również warianty alleliczne genu C667T reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR). Grupę badaną poddano obserwacji pod kątem wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych, w tym zgonów z przyczyn sercowo- naczyniowych oraz niezależnie od przyczyny. Najczęściej występującą współistniejącą chorobą sercowo-naczyniową w grupie chorych było nadciśnienie tętnicze

(u niemal 100% osób badanych). Ponadto u 20% chorych stwierdzono chorobę niedokrwinną serca w wywiadzie a 5,7% badanych przebyło udar mózgu. Najczęściej stosowanymi lekami w grupie badanej były ludzka rekombinowana erytropoetyna (91,1%), dożylne preparaty żelaza (58,3%) oraz kwas foliowy w dawce 15mg/dobę (39,3%).

Grupa badana charakteryzowała się znamienne niższym poziomem hemoglobiny, płytek krwi, cholesterolu całkowitego oraz HDL i LDL-cholesterolu oraz wyższym poziomem triglicerydów niż grupa kontrolna. W grupie badanej zaobserwowano wyższy poziom tHcy (mediana; [IQR] 21,5 $\mu\text{mol/l}$; [17,3-27,7] vs 10,7; [8,93-13,2], $p < 0,0001$), kwasu foliowego (21,55 ng/l ; [14,6-27,8] vs 9,92; [7,74-15,1], $p < 0,0001$), CRP (5,55 mg/l ; [2,21-11,48] vs 1,76; [0,8-2,9], $p < 0,001$) i 8-izoprostanów (301 pg/ml ; [260-380] vs 90 [36,4-136], $p = 0,0012$) w porównaniu z grupą kontrolną. Częstość wariantu TT genu MTHFR wynosiła w grupie badanej 26,4%. W grupie chorych hemodializowanych odnotowano wyższy poziom przeciwciał przeciwko N-Hcy-albuminie (absorbancja A490; 0,56; [0,49-0,623] vs 0,259; [0,198-0,338], $p < 0,0001$) i hemoglobinie (0,659 [0,597-0,723] vs 0,379 [0,289-0,442], $p < 0,0001$) w porównaniu do grupy kontrolnej. W obu grupach zaobserwowano korelację pomiędzy poziomem tHcy a poziomem przeciwciał przeciwko N ϵ -Hcy-albuminie ($r = 0,56$, $p < 0,0001$) oraz N ϵ -Hcy-hemoglobinie ($r = 0,67$, $p < 0,0001$). Poziom przeciwciał przeciwko N ϵ -Hcy-białkom był istotnie wyższy u chorych z wariantem TT genu C677T MTHFR niż u osób z pozostałymi genotypami. Nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem badanych przeciwciał a czynnikami demograficznymi. W grupie badanej odnotowano korelacje pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko N ϵ -Hcy-albuminie a poziomem 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ ($r = 0,48$, $p < 0,001$), kwasu foliowego ($r = -0,18$, $p = 0,0054$) i parathormonu ($r = 0,17$, $p = 0,0083$). Poziom przeciwciał przeciwko N ϵ -Hcy-hemoglobinie w grupie chorych dializowanych korelował z poziomem 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ ($r = 0,63$, $p < 0,0001$) oraz kwasu foliowego ($r = -0,38$, $p < 0,0001$). Stwierdzono istotnie niższy poziom przeciwciał przeciwko N ϵ -Hcy-albuminie u tych osób, które stosowały kwas foliowy w porównaniu do osób, które go nie przyjmowały (0,530; [0,408-0,615] vs 0,559; [0,515-0,625], $p = 0,002$). Nie zaobserwowano innych zależności pomiędzy poziomem badanych przeciwciał a przyjmowanymi lekami. W grupie badanej odnotowano słabą ujemną korelację pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko N ϵ -Hcy-albuminie a adekwatnością dializy wyrażoną współczynnikiem Kt/V ($r = -0,18$, $p = 0,0303$). Nie odnotowano podobnej zależności w odniesieniu do przeciwciał przeciwko N ϵ -Hcy-hemoglobinie ($r = -0,06$, $p = 0,43$). Nie odnotowano zależności pomiędzy

poziomem przeciwciał a czasem trwania terapii nerkozastępczej. Osoby z chorobą wieńcową (n =48) nie wykazywały istotnych różnic w poziomie przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-albuminie ani hemoglobinie w porównaniu do osób bez tego obciążenia (odpowiednio: 0,55; [0,495-0,599] vs 0,56; [0,451-0,618], p =0,93 i 0,656; [0,602-0,73] vs 0,655; [0,573-0,717], p =0,47). Nie stwierdzono również różnic pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-albuminie ani hemoglobinie u osób po udarze mózgu (n =15) w porównaniu do osób wolnych od tego obciążenia (odpowiednio: 0,559; [0,446-0,609] vs 0,558; [0,471-0,614], p =0,83 i 0,649; [0,563-0,707] vs 0,657 [0,594-0,722], p =0,79). Stosując model regresji liniowej jednoczynnikowej stwierdzono, że czynnikami istotnie wpływającymi na poziom przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-albuminie w grupie badanej są: poziom tHcy (r =0,23, p <0,0001) i 8-izo-PGF_{2α} (r =0,16, p <0,0001). W regresji wieloczynnikowej czynnikami wpływającymi na poziom przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-albuminie w grupie badanej były: poziom tHcy, kwasu foliowego oraz 8-izo-PGF_{2α}. Ze względu na silną korelację pomiędzy poziomem tHcy a poziomem izoprostanów i kwasu foliowego należy przyjąć, że czynnikiem niezależnie warunkującym poziom przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-albuminie jest poziom tHcy. Na podstawie regresji liniowej jednoczynnikowej stwierdzono, że na poziom przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-hemoglobinie w grupie badanej istotnie wpływają: poziom tHcy (r =0,29, p <0,0001), 8-izo-PGF_{2α} (r =0,28, p <0,0001) oraz kwasu foliowego (r =0,14, p <0,0001). W modelu wieloczynnikowej regresji liniowej czynnikami najsilniej wpływającymi na poziom przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-hemoglobinie w grupie badanej były: poziom tHcy oraz 8-izo-PGF_{2α}, przy czym interpretacja wyników powinna być najprawdopodobniej analogiczna do tej, którą przedstawiono w odniesieniu do przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-albuminie.

W czasie obserwacji (mediana 24 miesiące) u 34 z 247 badanych osób odnotowano łącznie 47 incydentów sercowo-naczyniowych. Osoby, u których odnotowano wystąpienie incydentu klinicznego były istotnie starsze (mediana wieku odpowiednio 65 lat; [55-71] vs 60; [49-70], p =0,0043). Epizod wystąpił częściej u chorych obciążonych chorobą wieńcową (OR =3,778; 95% CI: 1,516-9,415; p =0,0063) oraz udarem mózgu (OR =6,609; 95% CI: 2,034-21,473; p =0,0035). Nie zaobserwowano istotnych korelacji pomiędzy wystąpieniem incydentu klinicznego a płcią chorych, obecnością cukrzycy, jak również czasem leczenia dializami oraz adekwatnością dializy. Nie stwierdzono związku pomiędzy wystąpieniem incydentu sercowo-naczyniowego a analizowanymi wynikami

badań laboratoryjnych, poziomem tHcy ani poziomem przeciwciał przeciwko N-Hcy-białkom.

Podsumowując, w przedstawionej pracy stwierdzono, że u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych przewlekłe hemodializami stwierdza się większe poziomy przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-albuminie i hemoglobinie w surowicy w porównaniu z osobami dobranymi pod względem płci, wieku, czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, z kreatyniną <140 μmol/l. Poziom tych przeciwciał jest wyższy u chorych z nasilonym stresem oksydacyjnym. Stężenie tHcy jest niezależnym czynnikiem warunkującym poziom przeciwciał, a ani 8-izo-PGF_{2α} ani kwas foliowy nie były niezależnie związane z tymi poziomami u chorych hemodializowanych. Poziom przeciwciał przeciwko Nε-Hcy-białkom nie koreluje z ryzykiem wystąpienia epizodu sercowo-naczyniowego w odległej obserwacji klinicznej.

10. Summary

A role of the antibodies against N-homocysteinylated proteins in the pathogenesis of the cardiovascular diseases in the patients with the end-stage renal disease on long-term hemodialysis (HD) remains unclear. Neither the factors that determine the level of this antibodies, nor the clinical mechanisms by which the antibodies are involved in the pathogenesis of cardiovascular diseases in end-stage renal disease (ESRD) patients have been not established yet. The aim of this study was to characterize the factors that determine the level of antibodies against N-homocysteinylated albumin and hemoglobin in ESRD on long-term HD and to evaluate a correlation between the level of this antibodies and the occurrence of the cardiovascular episodes in this population.

Two hundred forty-seven patients (110 females) aged 23-89 (median age 61) years on maintenance hemodialysis for, on average 37 months and 60 age, sex and cardiovascular risk factor-matched controls with serum creatinine level <140 μmol/l were recruited to the study. Total plasma Hcy (tHcy) levels were determined by high-performance liquid chromatography. Serum folic acid and 8-isoprostaglandine F_{2α} (8-iso-PGF_{2α}) were measured using the immunoenzymatic methods. Serum levels of IgG antibodies against Nε-Hcy-albumin and hemoglobin were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay. The methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism was also determined.

The patients on haemodialysis were followed to record all cardiovascular (CV) episodes, including CV and all-cause deaths.

The most frequent cardiovascular comorbidity in HD patients was hypertension (almost 100% of patients), coronary heart disease (20%) and stroke (5.7%). 91.1% patients on HD were treated with erythropoietin, 58.3% received parenteral iron and 39.3% declared to receive regular folic acid supplementation (15 mg daily).

The patients on HD had lower level of hemoglobin, platelets, total cholesterol, HDL, LDL and higher level of triglycerides as compared to controls. In the HD group there were found higher levels of tHcy (median; [IQR] 21.5 $\mu\text{mol/l}$; [17.3-27.7] vs 10.7; [8.93-13.2], $p < 0.0001$), folate (21.55 ng/l; [14.6-27.8] vs 9.92; [7.74-15.1], $p < 0.0001$), CRP (5.55 mg/l; [2.21-11.48] vs 1.76; [0.8-2.9], $p < 0.001$) and 8-isoprostanes (301 pg/ml; [260-380] vs 90 [36.4-136], $p = 0.0012$) as compared to control group. The prevalence of TT genotype MTHFR gene in HD group was 26.4%.

In HD group levels of anti-N ϵ -Hcy-albumin (A490 absorbancy 0.56; [0.49-0.623] vs 0.259; [0.198-0.338], $p < 0.0001$) and hemoglobin (0.659 [0.597-0.723] vs 0.379 [0.289-0.442], $p < 0.0001$) were significantly higher as compared to controls. In both groups the correlations between tHcy level and anti-N ϵ -Hcy-albumin ($r = 0.56$, $p < 0.0001$) and anti-N ϵ -Hcy-hemoglobin ($r = 0.67$, $p < 0.0001$) were observed. Similar correlations were observed in the control group. The level of anti-N ϵ -Hcy-proteins was significantly higher in patients with TT genotype of MTHFR gene. There were no significant correlations between the level of antibodies and the demographic data. In HD group there were the correlations between the level of anti-N ϵ -Hcy-albumin and 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ ($r = 0.48$, $p < 0.001$), folate ($r = -0.18$, $p = 0.0054$) and parathyroid hormone ($r = 0.17$, $p = 0.0083$). The level of anti-N ϵ -Hcy-hemoglobin in HD group correlated with 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ ($r = 0.63$, $p < 0.0001$) and folate ($r = -0.38$, $p < 0.0001$). In HD group the level of anti-N ϵ -homocysteinylated albumin was significantly lower in this patients, who declared the regular supplementation with folic acid as compared to these, who denied taking this medicine (0.530; [0.408-0.615] vs 0.559; [0.515-0.625], $p = 0.002$). No other correlations between the level of antibodies and medications were detected.

In HD group there was a weak, negative correlation between the level of anti-N ϵ -Hcy-albumin and the dialysis adequacy measured as spKt/V coefficient ($r = -0.18$, $p = 0.0303$). No such correlation was detected according to anti-N ϵ -Hcy-hemoglobin. There was no significant correlation between the level of antibodies and the duration of hemodialysis maintenance therapy.

The levels of anti-N ϵ -Hcy-albumin and hemoglobin did not differ between the patients with the history of CAD ($n = 48$) and these, who were free from this comorbidity

(respectively: 0.55; [0.495-0.599] vs 0.56; [0.451-0.618], $p=0.93$ and 0.656; [0.602-0.73] vs 0.655; [0.573-0.717], $p=0.47$). There were no significant differences in the levels of anti-N ϵ -Hcy-albumin and hemoglobin between the patients with the history of stroke ($n=15$) as compared to the patients without cerebrovascular events (respectively: 0.559; [0.446-0.609] vs 0.558; [0.471-0.614], $p=0.83$ and 0.649; [0.563-0.707] vs 0.657 [0.594-0.722], $p=0.79$).

By the univariate linear regression the factors that shown the strongest association with the level of anti-N ϵ -homocysteinylated albumin were tHcy ($r=0.23$, $p<0.0001$) and 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ ($r=0.16$, $p<0.0001$). By the multivariate linear regression analysis the predictors of the level of anti-N ϵ -homocysteinylated albumin were tHcy, folate and 8-iso-PGF $_{2\alpha}$. Because of the strong association between tHcy and folate and between tHcy and 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ the only independent predictor of anti-N ϵ -homocysteinylated albumin level is tHcy.

By the univariate regression analysis the factors showing the strongest association with anti-N ϵ -homocysteinylated hemoglobin level were tHcy ($r=0.29$, $p<0.0001$), 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ ($r=0.28$, $p<0.0001$) and folate ($r=0.14$, $p<0.0001$). By the multivariate regression the predictors of the level of anti-N ϵ -Hcy-hemoglobin were tHcy and 8-iso-PGF $_{2\alpha}$. Because of the strong correlation between tHcy and 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ the results of the multivariate analysis must be interpreted in the same way as according to anti-N ϵ -Hcy-albumin.

During the clinical follow-up (median of time 24 months) 34 from 247 patients in HD group revealed 47 CV episodes. The group with the CV episode was significantly older (respectively 65 years; [55-71] vs 60; [49-70], $p=0.0043$). The episode happened more frequently in patients with the history of CAD (OR =3.778; 95% CI: 1.516-9.415; $p=0.0063$) and stroke (OR =6.609; 95% CI: 2.034-21.473; $p=0.0035$). There were no correlations between the CV episode and sex, presence of diabetes, the duration of HD maintenance therapy and the dialysis adequacy. There were no associations between CV episodes and laboratory findings, tHcy level and the levels of anti-N ϵ -Hcy-proteins.

In conclusion, patients with ESRD on long-term hemodialysis have higher levels of anti-N ϵ -homocysteinylated albumin and hemoglobin compared to age, sex and cardiovascular risk factor-matched controls with the serum creatinine level $<140 \mu\text{mol/l}$. The level of antibodies correlates with oxidative stress. Total Hcy is the independent predictor of levels of anti-N ϵ -homocysteinylated albumin and hemoglobin. Folate and 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ are not independently correlated with the level of these antibodies in HD patients. The level of anti-N ϵ -homocysteinylated proteins does not show the association with the risk for cardiovascular episodes in ESRD patients.

11. Piśmiennictwo:

1. NKF K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002; 39: S1-S246,
2. Levey AS, Eckhardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, De Zeeuw D, Hostetter TA, Lameire N, Eknoyan G. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2005; 67: 2089-2100.
3. Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Ann Intern Med.* 2003; 139-147.
4. Zhang QL, Rothenbacher D. Prevalence of chronic kidney disease in population – based studies: systematic review. *BMC Public Health.* 2008; 8: 117.
5. Król E, Rutkowski B, Czarniak P, Kraszewska E, Lizakowski S, Szubert R, Czekalski S, Sułowicz W, Więcek A. Early detection of chronic kidney disease: results of the PolNef study. *Am J Nephrol.* 2009; 29: 264-273.
6. Metcalfe W. How does early chronic kidney disease progress? A Background Paper prepared for the UK Consensus Conference on early Chronic Kidney Disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22: ix26-ix30.
7. Freedman BI. End-stage renal failure in African Americans: insight in kidney disease susceptibility. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17: 198-200.
8. Freedman BI, Hicks PJ, Bostrom MA, Cunningham ME, Liu Y, Divers J, Kopp JB, Winkler CA, Nelson GW, Langefeld CD, Bowden DW. Polymorphism in the non-muscle myosin heavy chain 9 gene (MYH9) are strongly associated with end-stage renal disease

historically attributed to hypertension in African Americans. *Kidney Int.* 2009; 75: 736-745.

9. Navis G, van der Kleij FG, de Zeeuw D, de Jong PE. Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and renal disease. *J Mol Med.* 1999; 77: 781-791.

10. Nordfors L, Lindholm B, Stenvinkel P. End-stage renal disease – not an equal opportunity disease: the role of genetic polymorphism. *J Intern Med.* 2005; 258: 1-12.

11. Keith DS, Nichols GA, Gullion CM, Brown JB, Smith DH. Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch Intern Med.* 2004; 164: 659-663.

12. Heras M, Fernandez-Reyes MJ, Guerrero MT, Sanchez R, Munoz A, Macias MC, Molina A, Prado F, Alvarez-Ude F. Elderly patients with chronic kidney disease: what happens after 24 months of follow-up? *Nefrologia.* 2009; 29: 343-349.

13. Johnson CA, Levey AS, Coresh J, Levin A, Lau J, Eknoyan G. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease in adults: Part II. Glomerular filtration rate, proteinuria and other markers. *Am Fam Physician.* 2004; 70: 1091-1097.

14. Król E, Rutkowski B. Przewlekła choroba nerek – klasyfikacja, epidemiologia i diagnostyka. *Forum Nefrologiczne.* 2008; 1: 1-6.

15. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron.* 1976;16: 31-41.

16. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Diseases Study Group. *Ann Intern Med.* 1999; 130: 461-470.

17. Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, Kusek JW, Van Lente F, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2006; 145: 247-254.

18. Lin J, Knight EL, Hogan ML, Singh AK. A comparison of prediction equations for estimating glomerular filtration rate in adults without kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 2573-2580.

19. Rule AD, Gussak HM, Pond GR, Bergstralh EJ, Stegall MD, Cosio FG, Larson TS. Measured and estimated GFR in healthy potential kidney donors. *Am J Kidney Dis.* 2004; 43: 112-119.

20. Haroun MK, Jaar BG, Hoffman SC, Comstock GW, Klag MJ, Coresh J. Risk factors for chronic kidney disease: a prospective study of 23,534 men and women in Washington County, Maryland. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 2934-2941.
21. Perneger TV, Brancati FL, Whelton PK, Klag MJ. End-stage renal disease attributable to diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 1994; 121: 912-918.
22. Barsoum RS. Chronic kidney disease in the developing world. *N Engl J Med.* 2006; 354: 997-999.
23. Foley RN, Collins AJ. End-stage renal disease in the United States: an update from the United States Renal Data System. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 2644-2648.
24. Nangaku M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Intern Med.* 2004; 43: 9-17.
25. Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease. The role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation and intrinsic renal disease. *N Eng J Med.* 1982; 307: 652-659.
26. Griffin KA, Bidani AK. Progression of renal disease: renoprotective specificity of renin-angiotensin system blockade. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006; 1: 1054-1065.
27. Neuringer JR, Brenner BM. Hemodynamic theory of progressive renal disease: a 10-year update in brief review. *Am J Kidney Dis.* 1993; 22: 98-104.
28. Vogt L, Navis G, De Zeeuw D. Renoprotection: a matter of blood pressure reduction or agent-characteristics? *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: S202-S207.
29. Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 17-25.
30. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med.* 1998; 339: 1448-1456.
31. Wang Y, Rankan GK, Tay YC, Wang Y, Harris DC. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by albumin is mediated by nuclear factor kappaB in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10: 1204-1213.
32. Tang S, Leung JC, Abe K, Chan KW, Chan LY, Chan TM, Lai KN. Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 2003; 111: 515-527.
33. Morigi M, Macconi D, Zoja C, Donadelli R, Buelli S, Zanchi C, Ghilardi M, Remuzzi G. Protein overload-induced NF-kappaB activation in proximal tubular cells requires H₂O₂ through a PKC-dependent pathway. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 1179-1189.

34. Arici M, Chana R, Lewington A, Brown J, Brunskill NJ. Stimulation of proximal tubular cell apoptosis by albumin-bound fatty acids mediated by peroxisome proliferator activated receptor-gamma. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 17-27.
35. Norman JT, Orphanides C, Garcia P, Fine LG. Hypoxia-induced changes in extracellular matrix metabolism in renal cells. *Exp Nephrol.* 1999; 7: 463-469.
36. Norman JT, Clark IM, Garcia PL. Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int.* 2000; 58: 2351-2366.
37. Strutz F, Zeisberg M. Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 2992-2998.
38. Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Inagi R, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Ingelfinger JR, Nangaku M. Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia. *Kidney Int.* 2004; 65: 871-880.
39. Son D, Kojima I, Inagi R, Matsumoto M, Fujita T, Nangaku M. Chronic hypoxia aggravates renal injury via suppression of Cu/Zn-SOD: a proteomic analysis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 294: F62-F72.
40. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int.* 2002; 62: 1524-1538.
41. Locatelli F, Canaud B, Eckhardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18: 1272-1280.
42. Nourooz-Zadeh J. Key issues in F₂-isoprostane analysis. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36: 1060-1065.
43. Shah SV, Baliga R, Rajapurkar M, Fonseca VA. Oxidants in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 16-28.
44. Patrignani P, Tacconelli S. Isoprostanes and other markers of peroxidation in atherosclerosis. *Biomarkers.* 2005; 10 (Suppl. 1): S24-S29.
45. Tang M, Cyrus T, Yao Y, Vocun L, Pratico D. Involvement of thromboxane receptor in the proatherogenic effect of isoprostane F_{2α}-III. Evidence from apolipoprotein E – and LDL receptor-deficient mice. *Circulation.* 2005; 112: 2867-2874.
46. Salomon RG, Batyreva E, Kaur K, Sprecher DL, Schreiber MJ, Crabb JW, Penn MS, DiCorletoe AM, Hazen SL, Podrez EA. Isolevuglandin-protein adducts in humans: products of free radical-induced lipid oxidation through the isoprostane pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1548: 225-235.

47. Canaud B, Cristol JP, Morena M, Leray-Moragues H, Bosc JY, Vaussenat F. Imbalance of oxidants and antioxidants in haemodialysis patients. *Blood Purif.* 1999; 17: 99-106.
48. Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K, Baynes JW. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of “carbonyl stress” in long-term uremic complications. *Kidney Int.* 1999; 55: 389-399.
49. Descamps-Latscha B, Drueke T, Witko-Sarsat V. Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial.* 2001; 14: 193-199.
50. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9 (12 Suppl): S16-23.
51. Parfrey PS, Foley RN. The clinical epidemiology of cardiac disease in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10: 1606-1615.
52. Robinson K. Renal disease, homocysteine and cardiovascular complications. *Circulation* 2004; 109: 294-295.
53. Locatelli F, Pozzoni P, Tentori F, Del Vecchio L. Epidemiology of cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18 (Suppl 7): vii2-vii9.
54. Gołębiowski T, Weyde W, Krajewska M, Kazimierczak, Derkacz A, Nowicki P, Klinger M. Choroba niedokrwienne serca u chorych leczonych nerkozastępczo. Część I. Epidemiologia, patologia zmian miażdżycowych, diagnostyka. *Postepy Hig Med Dosw.* 2006; 60: 286-289.
55. Herzog C. How to manage the renal patient with coronary heart disease: the agony and the ecstasy of opinion-based medicine. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 2556-2572.
56. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* 2007; 116: 85-97.
57. Mann JFE. Cardiovascular risk in patients with mild renal insufficiency: implications for the use of ACE inhibitors. *Presse Med.* 2005; 34: 1303-1308.
58. Segura J, Garcia-Donaire JA, Praga M, Ruilope LM. Chronic Kidney Disease as a situation of high added risk in hypertensive patients. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 136-140.
59. Cibulka R, Racek J. Metabolic disorders in patients with chronic kidney failure. *Physiol Res.* 2007; 56: 697-705.
60. Spiegel DM, Raggi P, Smits G, Block GA. Factors associated with mortality in patients new to haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22: 3568-3572.

61. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Novel cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15: S77-S80.
62. Zoccali C, Enia G, Tripepi G, Panuccio V, Mallamaci F. Clinical epidemiology of major nontraditional risk factors in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int.* 2005; 25(S3): S84-S87.
63. Culeton BF, Larson MG, Wilson PW, Evans JC, Parfrey PS, Levy D. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int.* 1999; 56: 2214-2219.
64. Parikh NI, Shih-Jen H, Larson MG, Meigs JB, Levy D, Fox CS. Cardiovascular disease risk factors in chronic kidney disease. *Arch Intern Med.* 2006; 166: 1884-1891.
65. Kundhal K, Lok CE. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract.* 2005; 101: c47-c52.
66. Ruilope LM, Salvetti A, Jamerson K, Hansson L, Warnold I, Wedel H, Zanchetti A. Renal function and intensive lowering of blood pressure in hypertensive participants of Hypertension Optimal Treatment (HOT) Study. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 218-255.
67. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic kidney disease and the risk of death, cardiovascular events and hospitalization. *N Eng J Med.* 2004; 351: 1296-1305.
68. Bostom AG, Shemin D, Verhoef P, Nadeau MR, Jacques PF, Selhub J, Dworkin L, Rosenberg IH. Elevated fasting total plasma homocysteine levels and cardiovascular disease outcomes in maintenance dialysis patients: a prospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 2554-2558.
69. Jungers P, Chaveau P, Bandin O, Chadefaux B, Aupetit J, Labrunie M, Descamps-Latscha B, Kamoun P. Hyperhomocysteinemia is associated with atherosclerotic occlusive arterial accidents in predialysis chronic renal failure patients. *Miner Electrolyte Metab.* 1997; 23: 170-173.
70. Moustapha A, Naso A, Nahlavi M, Gupta A, Arheart KL, Jacobsen DW, Robinson K, Dennis VW. Prospective study of hiperhomocysteinemia as adverse cardiovascular risk factor in end-stage renal disease. *Circulation* 1998; 97: 138-141.
71. Manns BJ, Burgess ED, Hyndman ME, Parsons HG, Schaefer JP, Scott-Douglas NW. Hyperhomocyst(e)inemia and the prevalence of atherosclerotic vascular disease in patients with end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998; 34: 669-677.

72. Mallamaci F, Zoccali C, Tripepi G, Fermo I, Benedetto FA, Cataliotti A, Bellanuova I, Malatino LS, Soldarini A. Hyperhomocysteinemia predicts cardiovascular outcomes in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2002; 61: 609-614.
73. Buccianti G, Baragetti I, Bamonti F, Furiani S, Dorighet V, Patrosso C. Plasma homocysteine levels and cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. *J Nephrol.* 2004; 17: 405-410.
74. Bayes B, Pastor MC, Bonal J, Junca J, Hernandez JM, Riutort N, Foraster A, Romero R. Homocysteine, C-reactive protein, lipid peroxydation and mortality in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18: 106-112.
75. Vychytil A, Fodinger M, Wolf G, Enzenberger B, Auinger M, Prischl F, Buxbaum M, Wiesholzer M, Mannhalter C, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Major determinants of hyperhomocysteinemia in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int.* 1998; 53: 1775-1782.
76. Menon V, Sarnak MJ, Greene T, Wang X, Pereira AA, Beck GJ, Kusek JW, Selhub J, Collins AJ, Levey AS, Shlipak MG. Relationship between homocysteine and mortality in chronic kidney disease. *Circulation* 2006; 113: 1572-1577.
77. Kalantar-Zadeh K, Block G, Humphreys MH, McAllister CJ, Kopple JD. A low, rather than a high, total plasma homocysteine is an indicator of poor outcome in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15: 442-453.
78. Wrone EM, Hornberger JM, Zehnder JL, McCann LM, Coplon NS, Fortmann SP. Randomized trial of folic acid for prevention of cardiovascular events in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15: 420-426.
79. Suliman ME, Stenvinkel P, Heimbürger O, Barany P, Lindholm B, Bergström J. Plasma sulfur amino acids in relation to cardiovascular disease, nutritional status and diabetes mellitus in patients with chronic renal failure at start of dialysis therapy. *Am J Kidney Dis.* 2002, 40: 480-483.
80. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paultre F, Diczfalusy U, Wang T, Berglund L, Jogestrand T. Strong association between malnutrition, inflammation and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1999; 55: 1899-1911.
81. Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B. Wasting, but not malnutrition, predicts cardiovascular mortality in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2004; 19: 2181-2183.
82. Suliman ME, Stenvinkel P. Contribution of inflammation to vascular disease in chronic kidney disease patients. *Saudi J Kidney Dis Transplant.* 2008; 19: 329-345.

83. Undas A, Jakubowski H. Letter by Undas and Jakubowski regarding article "Relationship between homocysteine and mortality in chronic kidney disease". *Circulation* 2006; 114: 574.
84. Marcus J, Sarnak MJ, Menon V. Homocysteine lowering and cardiovascular disease risk: Lost in translation. *Can J Cardiol.* 2007; 23: 707-710.
85. Scott JM, Weir DG. Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk.* 1998; 5: 223-227.
86. Bednarek-Tupikowska G, Tupikowski K. Homocysteina – niedoceniany czynnik ryzyka miażdżycy. Czy hormony płciowe wpływają na stężenie homocysteiny? *Postepy Hig Med Dosw.* 2004; 58: 381-389.
87. Wierzbicki AS. Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diab Vasc Dis Res.* 2007; 4: 143-149.
88. Beltowski J. Protein homocysteinylation: a new mechanism of atherogenesis? *Postepy Hig Med Dosw.* 2005; 59: 392-404.
89. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexo E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem.* 2004; 50: 13-32.
90. Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow R, Lentz SR, Jacobsen DW, Brattstrom L, Wilcken B, Wilcken DEL, Blom HJ, Stabler SP, Allen RH, Selhub J, Rosenberg IH. Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1704-1706.
91. Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocyst(e)ine, diet and cardiovascular diseases. A statement for healthcare professionals from Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation* 1999; 99: 178-182.
92. Lentz SR, Haynes WG. Homocysteine: is it a clinically important cardiovascular risk factor? *Cleve Clin J Med.* 2004; 71: 729-734.
93. Mudd SH, Uhlendorf BW, Freeman JM, Finkelstein JD, Shih VE. Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972, 46: 905-912.
94. de Bree A, Verschuren MWM, Kromhout D, Kluijtmans LAJ, Blom HJ. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev.* 2002; 54: 599-618.
95. Ciaccio M, Bivona G, Bellia C. Therapeutical approach to plasma homocysteine and cardiovascular risk reduction. *Ther Clin Risk Manag.* 2008; 4: 219-224.

96. Moczulski D, Fojcik H, Żukowska – Szczechowska E, Szydłowska I, Grzeszczak W. Effects of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene on the genetic predisposition for diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 1535-1540.
97. van Guldener C. Why is homocysteine elevated in renal failure and what can be expected from homocysteine-lowering? *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21: 1161-1166.
98. Zucchelli P. The careful correction of renal insufficiency abnormalities: early is good. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15[Suppl 2]: 2-6.
99. Bostom AG, Culleton BF. Hyperhomocysteinemia in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10: 891-900.
100. Friedman AN, Bostom AG, Selhub J, Levey AS, Rosenberg IH. The kidney and homocysteine metabolism. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12: 2181-2189.
101. Wollesen F, Brattstrom L, Refsum H, Ueland PM, Berglund L, Berne C. Plasma total homocysteine and cysteine in relation to glomerular filtration rate in diabetes mellitus. *Kidney Int*. 1999; 55: 1028-1035.
102. Amadottir M, Hultberg B. The effect of vitamin B12 on total plasma homocysteine concentration in folate-replete hemodialysis patients. *Clin Nephrol*. 2003; 59: 186-189.
103. Pastore A, De Angelis S, Casciani S, Ruggia R, Di Giovamberardino G, Noce A, Splendiani G, Cortese C, Federici G, Dessi M. Effects of folic acid before and after vitamin B₁₂ on plasma homocysteine concentrations in hemodialysis patients with known MTHFR genotypes. *Clin Chem*. 2006; 52: 145-148.
104. Righetti M, Ferrario GM, Milani S, Serbelloni P, La Rosa L, Uccellini M, Sessa A. Effects of folic acid treatment on homocysteine levels and vascular disease in hemodialysis patients. *Med Sci Monit*. 2003; 9: 37-42.
105. Friedman AN. Pharmacologic B-vitamin therapy for homocysteinemia in dialysis patients: has the time come? *Nutr Clin Care*. 2002; 5: 20-24.
106. Sombolos K, Fragia T, Tad'sir N, Bartholomatos G, Karagianni A, Katsaris G, Christidou F, Bamichas G, Stangou M, Papagalanis N. The effect of long-term intravenous high dose B-complex vitamins with or without folic acid on serum homocysteine in hemodialysis patients. *J Nephrol*. 2002; 15: 671-675.
107. de Gomez Dumm NT, Giammona AM, Touceda LA. Variations in the lipid profile of patients with chronic renal failure treated with pirydoxine. *Lipids in Health and Disease*. 2003; 2:7.
108. Antoniadis C, Shirodaria C, Stefanadis C, Channon KM. Homocysteine lowering: any use in atherosclerosis? *Hellenic J Cardiol*. 2007; 48: 249-251.

109. Topal G, Brunet A, Millanvoye E, Boucher JL, Rendu F, Devynck MA, David-Dufilho M. Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36: 1532-1541.
110. Antoniadis C, Antonopoulos AS, Tousoulis A, Marinou K, Stefanadis C. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials. *Eur Heart J.* 2009; 30: 6-15.
111. Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ.* 2004; 11: 56-64.
112. Okubo K, Hayashi K, Wakino S, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Tokuyama H, Yamamoto T, Kajiya F, Saruta T. Role of asymmetrical dimethylarginine in renal microvascular endothelial dysfunction in chronic renal failure with hypertension. *Hypertens Res.* 2005; 28: 181-189.
113. Stenvinkel P, Carrero JJ, Axelsson J, Lindholm B, Heimbürger O, Massy Z. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3: 505-521.
114. Jiang X, Yang F, Tan H, Liao D, Bryan RM Jr, Randhawa JK, Rumbaut RE, Durante W, Scharef AI, Yang X, Wang H. Hyperhomocysteinemia impairs endothelial function and eNOS activity via PKC activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 2515-2521.
115. Mezei C, Schumann J, Wagner A, Gross P. Effects of homocysteine on the levels of caveolin-1 and eNOS in caveolae of human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2007; 190: 256-263.
116. Tousoulis D, Antoniadis C, Marinou K, Vasiliadou C, Bouras G, Stefanadi E, Latsios G, Toutouzas K, Stefanadis C. Methionine-loading rapidly impairs endothelial function by mechanisms independent of endothelin-1: evidence for an association of fasting total homocysteine with plasma endothelin-1 levels. *J Am Coll Nutr.* 2008; 27: 379-386.
117. Drunat S, Moatti N, Demuth K. Homocysteine decreases endothelin-1 expression by interfering with the AP-1 signaling pathway. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 659-668.
118. Medina MA, Urdiales JL, Amores-Sanchez MI. Roles of homocysteine in cell metabolism. Old and new functions. *Eur J Biochem.* 2001; 268: 3871-3882.
119. Bostom AG, Selhub J. Homocysteine and arteriosclerosis. Subclinical and clinical disease associations. *Circulation.* 1999; 99: 2361-2363.

120. Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1993; 13: 1327-1333.
121. Undas A, Williams EB, Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C. *J Biol Chem.* 2001; 276: 4389-4397.
122. Gerdes VEA, Kremer Hovinga HA, Ten Cate H, MacGillavry MR, Leijte A, Reitsma PH, Brandjes DPM, Buller HR. Homocysteine and markers of coagulation and endothelial cell activation. *J Thromb Haemost.* 2004; 2: 445-451.
123. Undas A, Brożek J, Szczeklik A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence. *Thromb Haemost.* 2005; 94: 907-915.
124. Undas A, Brożek J, Jankowski M, Siudak Z, Szczeklik A, Jakubowski H. Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 1397-1404.
125. Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implication for vascular disease. *Circulation.* 2001; 103: 2717-2723.
126. Sung FL, Siow YL, Wang G, Lynn EG O K. Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells leading to enhanced monocyte chemotaxis. *Mol Cell Biochem.* 2001; 216: 121-128.
127. Zhang L, Jin M, Hu XS, Zhu JH. Homocysteine stimulates nuclear factor kappaB activity and interleukin-6 expression in rat vascular smooth muscle cells. *Cell Biol Int.* 2006; 30: 592-597.
128. Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med.* 2002; 252: 283-294.
129. Au-Yeung KKW, Woo CWH, Sung FL, Yip JCW, Siow YL, Karmin O. Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor- κ B in endothelial cells via oxidative stress. *Circ Res.* 2004; 94: 28-36.
130. Perła-Kajan J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids.* 2007; 32: 561-572.
131. Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J.* 1999; 13: 2277-2283.

132. Hajjar KA. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest.* 1993; 91: 2873-2879.
133. Majors AK, Sengupta S, Willard B, Kinter MT, Pyeritz RE, Jacobsen DW. Homocysteine binds to human plasma fibronectin and inhibits its interaction with fibrin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1354-1359.
134. Jakubowski H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J Biol Chem.* 1997; 272: 1935-1942.
135. Jakubowski H. Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease. *J Biol Chem.* 2002; 277: 30425-30428.
136. Jakubowski H. Patophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr.* 2006; 136: 1741-1749.
137. Chwatko G, Jakubowski H. The determination of homocysteine thiolactone in human plasma. *Anal Biochem.* 2005; 337: 271-277.
138. Jakubowski H. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylated in humans. *J Nutr.* 2000; 130: 377-381.
139. Chwatko G, Jakubowski H. Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans. *Clin Chem.* 2005; 51: 408-415.
140. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *J Physiol Pharmacol.* 2008; 59 (Suppl 9): 155-167.
141. Jakubowski H. Anti-N-homocysteinylated protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med.* 2005; 43: 1011-1014.
142. Bogdanski P, Pupek-Musialik D, Dytfeld J, Lacinski M, Jablecka A, Jakubowski H. Plasma homocysteine is a determinant of tissue necrosis factor-alpha in hypertensive patients. *Biomed Pharmacoter.* 2008; 62: 360-365.
143. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83: 456S-460S.
144. Jakubowski H. New method for the determination of protein N-linked homocysteine. *Anal Biochem.* 2008; 380: 257-261.
145. Liu G, Nellaiappan K, Kagan HM. Irreversible inhibition of lysyl oxidase by homocysteine thiolactone and its selenium and oxygen analogues. Implications for homocystinuria. *J Biol Chem.* 1997; 272: 32370-32377.

146. Ferretti G, Bacchetti T, Marotti E, Curatola G. Effect of homocysteinylation on human high-density lipoproteins: a correlation with paraoxonase activity. *Metabolism*. 2003; 52: 146-151.
147. Głowacki R, Jakubowski H. Cross-talk between Cys34 and lysine residues in human serum albumin revealed by N-homocysteinylation. *J Biol Chem*. 2004; 279: 10864-10871.
148. Perła-Kajan J, Marczak L, Kajan L, Skowronek P, Twardowski T, Jakubowski H. Modification by homocysteine thiolactone affects redox status of cytochrome c. *Biochemistry*. 2007; 46: 6225-6231.
149. Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, Vignini A, Nanetti L, Curatola G. Effect of homocysteinylation of low density lipoproteins on lipid peroxidation of human endothelial cells. *J Cell Biochem*. 2004; 92: 351-360.
150. Sauls DL, Lockhart E, Warren ME, Lenkowski A, Wilhelm SE, Hoffman M. Modification of fibrinogen by homocysteine thiolactone increases resistance to fibrinolysis: a potential mechanism of the thrombotic tendency in hyperhomocysteinemia. *Biochemistry*. 2006; 45: 2480-2487.
151. Undas A, Perla J, Lacinski M, Trzeciak W, Kazmierski R, Jakubowski H. Autoantibodies against N-homocysteinylation proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke*. 2004; 35: 1299-1304.
152. Undas A, Jankowski M, Twardowska M, Padjas A, Jakubowski H, Szczeklik A. Antibodies to N-homocysteinylation albumin as a marker for early-onset coronary artery disease in men. *Thromb Haemost*. 2005; 93: 346-350.
153. Padjas A, Undas A, Swadzba J, Musial J. Antibodies to N-homocysteinylation albumin in patients with systemic lupus erythematosus. *Pol Arch Med Wewn*. 2007; 117: 80-85.
154. Undas A, Kolarz M, Kopeć G, Głowacki R, Płaczkiwicz – Jankowska E, Tracz W. Autoantibodies against N-homocysteinylation proteins in patients on long-term haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22: 1685-1689.
155. Accinni R, Bartesaghi S, De Leo G, Cursano CF, Achilli G, Loaldi A, Cellerino C, Parodi O. Screening of homocysteine from newborn blood spots by high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. *J Chromatogr A*. 2000; 896: 183-189.
156. Ubbink JB. Assay methods for the measurement of total homocyst(e)ine in plasma. *Semin Thromb Hemost*. 2000; 26: 233-241.

157. Brown GW, Hayden GF. Nonparametric methods. Clinical applications. Clin Pediatr (Phila). 1985; 24: 490-498.
158. Marill KA. Advanced statistics: linear regression, part I: simple linear regression. Acad Emerg Med. 2004; 11: 87-93.
159. Marill KA. Advanced statistics: linear regression, part II: multiple linear regression. Acad Emerg Med. 2004; 11: 94-102.
160. Duleba AJ, Olive DL. Regression analysis and multivariate analysis. Semin Reprod Endocrinol. 1996; 14: 139-153.
161. Daugirdas JT. Second generation logarithmic estimates of single-pool variable volume Kt/V: an analysis of error. J Am Soc Nephrol. 1993; 4: 1205-1213.
162. Undas A, Stepień E, Głowacki R, Tisończyk J, Tracz W, Jakubowski H. Folic acid administration and antibodies against homocysteinylated proteins in subjects with hyperhomocysteinemia. Thromb Haemost. 2006; 96: 342-347.
163. Handelman GJ, Walter MF, Adhikarla R, Gross J, Dallai GE, Lewin NW, Blumberg JB. Elevated plasma F₂-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. Kidney Int. 2001; 59: 1960-1966.
164. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, Himmelfarb J. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. Kidney Int. 2004; 65: 1009-1016.
165. Jakubowski H, Zhang L, Bardeguet A, Aviv A. Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylated in human endothelial cells: implication for atherosclerosis. Circ Res. 2000; 87: 45-51.
166. Jakubowski H, Ambrosius WT, Pratt JH. Genetic determinations of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis. FEBS Lett. 2001; 491: 35-39.
167. Perła-Kajan J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylated in humans. FASEB J. 2010; 24: 000-000 [publikacja w formie elektronicznej].
168. Gur M, Yildiz A, Demirbag R, Yilmaz R, Aslan M, Ozdogru I, Erel O. Paraoxonase and arylesterase activities in patients with cardiac syndrome X, and their relationship with oxidative stress markers. Coron Artery Dis. 2007; 18: 89-95.

169. Senturk T, Sarandol E, Gullulu S, Erdinc S, Ozdemir B, Baran I, Aydinlar A. Association between paraoxonase 1 activity and severity of coronary artery disease in patients with acute coronary syndromes. *Acta Cardiol.* 2008; 63: 361-367.
170. Suehiro T, Ikeda Y, Shiinoki T, Inoue M, Kumon Y, Itahara T, Hashimoto K. Serum paraoxonase (PON1) concentrations in patients undergoing hemodialysis. *J Atheroscler Thromb.* 2002; 9: 133-138.
171. Perna AF, Satta E, Acanfora F, Lombardi C, Ingrosso D, De Santo NG. Increased plasma protein homocysteinylation in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2006; 69: 869-876.
172. Antoniadis C, Shirodaria C, Warrick N, Cai S, de Bono J, Lee J, Leeson P, Neubauer S, Ratnatunga C, Pillai R, Refsum H, Channon KM. 5-methyltetrahydrofolate rapidly improves endothelial function and decreases superoxide production in human vessels: effects on vascular tetrahydrobiopterin availability and endothelial nitric oxide synthase coupling. *Circulation.* 2006; 114: 1193-1201.
173. Shirodaria C, Antoniadis C, Lee J, Jackson CE, Robson MD, Francis JM, Moat SJ, Ratnatunga C, Pillai R, Refsum H, Neubauer S, Channon KM. Global improvement of vascular function and redox state with low-dose folic acid: implications for folate therapy in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2007; 115: 2262-2270.
174. Yee-Moon Wang A, Woo J, Wai-Kei Lam C, Wang M, Man-Mei Sa M, Lui SF, Kam-Tao Li P, Sanderson J. Is a single time point C-reactive protein predictive of outcome in peritoneal dialysis patients? *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 1871-1879.
175. Ibrahim S, El Dessokiy O. Prevalence of methylenetetrahydrofolate gene (MTHFR) C677T polymorphism among chronic hemodialysis patients and its association with cardiovascular disease: a cross-sectional analysis. *Clin Exp Nephrol.* 2009; 13: 501-507.
176. Al-Muhanna F, Al-Mueilo S, Al-Ali A, Larbi E, Rubaish A, Abdulmohsen MF, Al-Zahrani A, Al-Ateeq S. Polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase, Plasminogen Activator Inhibitor-1 and apolipoprotein E in hemodialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transplant.* 2008; 19: 937-941.
177. Fodinger M, Mannhalter C, Wolf G, Pabinger I, Muller E, Schmid R, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Mutation (677 C to T) in the methylenetetrahydrofolate reductase gene aggravates hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1997; 52: 517-523.