Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Lek med. Eve Janusz – Grzybowska

Stężenia witaminy C podczas zabiegu hemodializy

Praca doktorska *

Promotor: Prof. dr hab. med. Władysław Sułowicz

Pracę wykonano w Katedrze i Klinice Nefrologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Kraków 2005

* Praca zrealizowana w ramach grantu promotorskiego KBN nr 6 PO5B 025 21

Podziękowania

Panu Profesorowi Władysławowi Sułowiczowi pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania za duchowe wsparcie i wieloletnią opiekę oraz za pomoc i cenne rady okazane przy realizacji niniejszej pracy,

Panu Profesorowi Jerzemu Naskalskiego i Pani Profesor Zofii Zachwieji za pomoc w oznaczeniu stężenie witaminy C i pierwiastków śladowych

oraz Wszystkim Tym, którzy pomogli mi w trakcie prowadzenia badań i urzeczywistnienia niniejszej pracy.

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY……..... 4

2. WSTĘP……..6
2.1. Wprowadzenie……...…..6
2.2. Witamina C – właściwości…….....7
2.3. Witamina C a stres oksydacyjny……...……11
2.4. Witamina C a hemodializa…….....16
2.5. Stężenia witaminy C u chorych hemodializowanych……..... 17
2.6. Witamina C a żelazo i erytropoetyna……...23
2.6.1.Metabolizm żelaza……... 23
2.6.2.Transport i magazynowanie żelaza…….. 24
2.6.3.Niedobór żelaza/przeładowanie żelazem u pacjentów z niewydolnością nerek…….…….27
2.6.4.Erytropoetyna, żelazo/nadmiar żelaza a witamina C …….…. 32

3. CEL PRACY……..37

4. MATERIAŁ I METODYKA……..38
4.1. Materiał kliniczny……38
4.2.1.Ocena stanu klinicznego, wywiady dietetyczne……. 41
4.1.1.1. Badanie podmiotowe……41
4.1.1.2. Badanie przedmiotowe……..41
4.2. Metodyka oznaczania stężeń witaminy C……...42
4.2.1.Oznaczanie stężeń witaminy C……. 42
4.2.2.Badania biochemiczne…… 44
4.2.3.Ocena parametrów określających adekwatność dializy…… 45
4.2.4.Analiza statystyczna……... 45

5. WYNIKI…….. 47
5.1. Analiza stężeń witaminy C podczas obserwacji jednorocznej……47
5.1.1.Stężenia witaminy C w grupie chorych dializowanych i w grupie kontrolnej……..47
5.1.2.Spadek stężeń witaminy C podczas zabiegu hemodializy……... 60
5.1.3.Analiza ankiet dietetycznych…… …… 65
5.2. Analiza stężeń witaminy C podczas dwumiesięcznej suplementacji – drugi rok badania……69

6. DYSKUSJA……..91

7. WNIOSKI…… 112

8. ANEKS……113

9. PIŚMIENNICTWO…… 119

10. STRZESZCZENIA……..135

1. WYKAZ SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY

ABPG	Anemia Best Practise Guidelines	
AGE's	advanced glycosylation end-products	końcowe produkty glikacji
Al		glin
ALOP	advanced lipid oxidation products	produkty końcowe oksydacji lipidów
AOPP	advanced oxidation products	późne produkty oksydacji białek
ATP	adenosine triphosphate	adenozynotrifosforan
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	cykliczny adenozynomonofosforan
CAT	catalase	katalaza
CL-EE	high-flux vitamin E-coated membrane	błona dializacyjna typu *high-flux* powlekana witaminą E
CML	N epsilon-(Carboxymethyl)lysine	N^{ϵ}-karboksymetyl-lizyny
CRP	C-reactive protein	białko C- reaktywne
DO		dializa otrzewnowa
EBPG	European Best Practise Guidelines	
ERA-EDTA	European Renal Association - European Dialysis and Transplantation Association	
Fe	iron	żelazo
FMC	Fresenius Medical Care	
GRF	glomerular filtration rate	filtracja kłębuszkowi
GSH	glutathione	glutation
GSH-Px	glutathione peroxidase	peroksydaza glutationu
HD	hemodialysis	hemodializa
HDF	haemodiafiltration	hemodiafiltracja
HDL	high density lipoproteins	lipoproteiny wysokiej gęstości
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography	wysokosprawna chromatografia cieczowa
IBW	ideal body weight	idealny ciężar ciała
ICNND	Interdepartmental Committee on Nutrition for National Defense	Międzywydziałowy Komitet Obrony Cywilnej do Spraw Żywienia
IFN-δ	interferon-δ	interferon-δ
IL-1	interleukin-1	interleukina-1
IL-6	interleukin-6	interleukina-6
iPTH	intact parathyroid hormone	natywny parathormon
IRP	iron regulatory protein	białko regulujące homeostazę jonów żelazowych
Kc	cellular clearance	klirens komórkowy
KoA	overall mass transfer coefficient	współczynnik przepuszczalności masowej
KT/V	dialysis index	wskaźnik dializy
LDL	low density lipoprotein	lipoproteiny niskiej gęstości
LRP	LDL receptor related protein	receptor E, receptor remnantów
MDA	malondialdehyde	dialdehyd malonylowy

NKF DOQI	National Kidney Foundation Dialysis Outcomes Quality Initiative	
OLDLA	oxidized LDL antibodies	przeciwciała przeciwko utlenionym LDL
oxiAA	oxidized form of ascorbic acid	utleniona forma witaminy C
PGE	prostaglandin E	prostaglandyna
PGE_1	prostaglandin E	prostaglandyna E_1
PGI	prostaglandin I	prostaglandyna I
PGI_2	prostaglandin I_2	prostaglandyna I_2
PRCA	Pure Red Cell Anemia	wybiórcza aplazja układu czerwonokrwinkowego
RDA	Recommended Dietary Allowance	rekomendowane dzienne zapotrzebowanie
rHuEPO	recombinant human erythropoietin	ludzka rekombinowana erytropoetyna
ROS	Reactive Oxygen Species	reaktywne związki tlenowe
SNN		schyłkowa niewydolność nerek
SOD	superoxide dismutase	dysmutaza ponadtlenkowa
SPVV	single pool volume variable	model 1-przedziałowy ze zmienną objętością dystrybucji
SR	scavenger receptor	receptor wymiatający
sTfR	soluble Transferrin Receptor	rozpuszczalny receptor dla transferyny
TIBC	Total Iron Binding Capacity	całkowitej zdolności wiązania żelaza
TNF-α	Tumor Necrosis Factor - alpha	czynnik martwicy nowotworu - alfa
TSAT	Total Transferin Saturation	poziom wysycenia transferyny
β_2m	beta-2-microglobulin	β_2-mikroglobulina

2. WSTĘP

2.1. Wprowadzenie

Według danych Fresenius Medical Care (FMC) w roku 2003 z powodu schyłkowej niewydolności nerek (SNN) było leczonych na świecie 1 700 000 ludzi, w tym 1 158 000 hemodializami (HD) i 141 000 dializami otrzewnowymi (DO) (56). Stan zdrowia wielu z nich pozostawiał sporo do życzenia. Śmiertelność w grupie dializowanych (10 – 26 %) wskazuje na fakt, że dializa jest zabiegiem ratującym życie ale wysokie wskaźniki współchorobowości i śmiertelności nie świadczą bynajmniej, że zbliżono się do szczytnego celu utrzymania przy życiu wszystkich chorych z SNN, po wyeliminowaniu przyczyn niepowodzenia niezależnych od mocznicy.

Chorzy dializowani to złożona populacja, utrzymywana przy życiu dzięki współczesnej wiedzy medycznej i technice. Problemy łączące się z przewlekłym leczeniem powtarzaną hemodializą wynikają z jednej strony z niedoskonałości tej terapii w obecnej, powszechnie zaakceptowanej formie (3 zabiegi tygodniowo; trwające od 4 do 5 godzin każdy) jak i ze skutków ubocznych samej dializy oraz nieskutecznie wyrównanej mocznicy.

Zagadnienie gospodarki witaminą C u chorych dializowanych należą do tych, o których wiele pisano, niemniej wiele problemów z nią zawiązanych nadal nie doczekało się satysfakcjonującego wytłumaczenia.

Chorzy ze SNN wymagający dializoterapii (np. hemodializy) są podatni na wystąpienie niedoboru kwasu askorbinowego. Przyczyną niedoboru może być zarówno jego utrata w trakcie trwania dializy **(**spowodowana swobodnym przechodzeniem witaminy C przez błonę dializacyjną do dializatu**)** jak i ograniczenie podaży w produktach spożywczych**,** wynikające ze stosowania diety z ograniczeniem owoców i warzyw po to, by zapobiec hiperkaliemii. Jednocześnie produkty te stanowią najważniejsze źródło witaminy C (p. Aneks; tab. XXXI, tab. XXXII).

Utrata witaminy C w trakcie dializy w powiązaniu z niedostateczną podażą, mogą prowadzić do obniżenia jej stężenia w osoczu. To z kolei może prowadzić do jawnego lub subklinicznego niedoboru (40, 41, 62, 106, 108, 109, 133, 168).

Witamina C jest nie tylko istotnym mikroskładnikiem niezbędnym dla prawidłowych czynności metabolicznych ustroju ale jest także jednym z elementów składowych fizjologicznej bariery antyoksydacyjnej oraz ważnym elementem wpływającym na gospodarkę żelazem. Chorzy hemodializowani muszą mieć zapewnioną wystarczającą ilość żelaza, aby mogli właściwie odpowiedzieć na leczenie ludzką rekombinowaną erytropoetynę (rHuEPO). Niektórzy chorzy z dużymi zapasami żelaza wykazują zmniejszoną odpowiedź na rHuEPO z powodu upośledzonej jego biodostępności (32, 38, 58, 69, 86, 92, 101, 103, 140, 155, 163). Czynnościowy niedobór żelaza powstaje wtedy, gdy rHuEPO pobudza erytropoezę do tego stopnia, iż zapotrzebowanie na ustrojowe żelazo przekracza ilość związaną i udostępnioną przez transferynę (129). Optymalnym sposobem leczenia u takich chorych jest suplementacja żelaza. Podstawowym problemem, jaki pozostaje do rozstrzygnięcia, jest droga podaży żelaza oraz dawka (101, 103, 104, 137, 147, 161, 163). Prowadzona od dłuższego czasu dyskusja, czy można leczyć czynnościowy niedobór żelaza u chorych z nadmiernym zapasem żelaza ustrojowego przy pomocy jego parenetralnej suplementacji (nie prowadząc do wtórnej hemosyderozy lub innych objawów ubocznych) nie pozwala na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków (36, 40, 78, 101, 102, 103, 155, 161, 163). Jednym z sposobów zmniejszenia oporności na rHuEPO u tych chorych wydaje się być podaż witaminy C (36, 40, 144, 155, 163).

2.2. Witamina C – właściwości

Witaminy są zewnątrzpochodnymi organicznymi składnikami odżywczymi niezbędnymi do utrzymania na właściwych poziomie różnorodnych reakcji biochemicznych. Związki te nie są syntetyzowane w organizmie lub są syntetyzowane w niewystarczających ilościach i dlatego muszą być dostarczane z zewnątrz, najczęściej z pożywieniem. Witaminy stanowią niejednorodną grupę substancji. Wiele witamin jest nietrwałych i łatwo ulega utlenieniu lub innym przemianom. Często stosowany podział witamin zależy od dróg transportu w organizmie, wynikającego ze zdolności do rozpuszczania i można je podzielić na (113):

1. Witaminy rozpuszczalne w wodzie, do których zalicza się:
   - witaminę C (kwas askorbinowy),
   - witaminy kompleksu B: witaminę B_1 (tiaminę), witaminę B_2 (ryboflawinę), witaminę B_3 (niacynę, kwas nikotynowy), witaminę B_5 (kwas pantotenowy), witaminę B_6 (pirydoksynę, pirydoksaminę, pirydoksal), witaminę B_{12} (kobalaminę), biotynę i kwas foliowy (kwas pteroiloglutaminowy).

2. Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach:

- witaminę A (kwas retinilowy),
- witaminę D (cholekalcyferol),
- witaminę E (tokoferol),
- witaminę K (fitochinon).

Brak lub niedobór witamin w pożywieniu jest przyczyną specyficznych zaburzeń i chorób. Najczęściej nie mamy do czynienia z brakiem jednej tylko witaminy – ale wielu z nich, co określa się mianem tzw. wieloczynnikowych stanów niedoborowych. W odróżnieniu od witamin rozpuszczalnych w tłuszczach – witaminy rozpuszczalne w wodzie (w razie ich nadmiaru) – są wydalane z moczem. Nadmiar pozostałych może prowadzić do pojawienia się objawów zatrucia (100, 113, 123).

Witamina C – kwas askorbinowy – jest substancją rozpuszczalną w wodzie, o ciężarze cząsteczkowym 176,1 g/mol. Kwas askorbinowy ($C_5H_8O_6$) jest gamma-laktonem 2,3-endiol kwasu L-gulonowego, o silnych właściwościach redukcyjnych. Ta witamina w świecie roślin oraz u większości ssaków jest syntetyzowana z glukozy. Ludzie, małpy i świnki morskie nie mają tej zdolności ze względu na mutację genu kodującego oksydazę L-gulonolaktonową. Uniemożliwia to endogenną syntezę powodując, że kwas askorbinowy musi być dostarczany z pożywieniem (5, 18, 100, 113, 123, 144). Głównym źródłem kwasu askorbinowego są świeże owoce i warzywa. Do produktów najbogatszych w kwas askorbinowy należą owoce dzikiej róży, czarne porzeczki, truskawki, kiwi, owoce cytrusowe, a z warzyw – kapusta i jej odmiany. W Polsce znaczącą rolę w pokrywaniu zapotrzebowania na witaminę C, z uwagi na ich duże spożycie, pełnią ziemniaki (16). Zawartość witaminy C w różnych produktach roślinnych waha się w szerokich granicach zależnie od gatunku, stopnia dojrzałości i sposobu ich przechowywania (16).

Witamina C należy do grupy witamin najmniej trwałych. Podczas przechowywania i przetwarzania produktów spożywczych oraz w trakcie procesów kulinarnych następuje utrata około 75% kwasu askorbinowego. Przyczyną tego stanu jest duża wrażliwość witaminy na procesy utleniania, szczególnie szybko zachodzące wysokich temperaturach i w obecności śladowych ilości metali i enzymów. Przykładowo, środowisko alkaliczne lub obojętne powstałe wskutek dodawania sody do gotowania przyspiesza rozpad witaminy C; środki antyseptyczne stosowane do konserwowania przetworów warzywnych i owocowych (benzoesan sodu, kwas salicylowy), niektóre leki (aspiryna, sulfonamidy, pochodne barbiturowe) oraz promienie ultrafioletowe, rozkładają tę witaminę. Działanie środowiska kwaśnego (pH < 5) i niska temperatura, a w szczególności zamrażanie – hamują działanie

askorbinazy i tym samym zmniejszają rozkład witaminy C (10, 83). Ziemniaki przechowywane w temperaturze pokojowej tracą miesięcznie 15% wyjściowej zawartości witaminy C, a pod wpływem gotowania i obierania następuje utrata dalszych 30 – 50 % (16). Często stosowana przez chorych hemodializowanych procedura przygotowywania produktów spożywczych, jak wydłużenie czasu moczenia i podwojony czas gotowania warzyw, celem redukcji zawartości potasu, powoduje inaktywację witaminy C (167).
Aktywną formą witaminy C jest kwas askorbinowy, który jest donorem równoważników redukujących w wielu reakcjach biochemicznych (*).

Do najważniejszych właściwości kwasu askorbinowego należy jego zdolność do odwracalnego utleniania i redukcji. W trakcie reakcji biochemicznych ulega on utlenieniu do kwasu dehydroksyaskorbinowego, z którego (przez proces redukcji) może ponownie powstawać aktywna witamina C (51, 100, 113). Dalszymi pośrednimi i końcowymi produktami oksydatywnej degradacji kwasu askorbinowego są kwas 2,3-diketo-L-gulonowy, kwas L-treonowy oraz kwas szczawiowy. Witamina C znajduje się w większości tkanek, ale największe jej stężenie występuje w tkankach gruczołowych (np. przysadce, korze nadnerczy, ciałku żółtym, grasicy). Przykładowo, w siatkówce oka stężenie witaminy C jest 20 – 30 razy większe niż w osoczu (43, 100, 113). Mechanizm działania kwasu askorbinowego nie został w pełni poznany ale wiadomo, że jest ona kofaktorem szeregu enzymów biorących udział w biosyntezie różnych substancji. Niedobór witaminy C prowadzi do powstania zespołu chorobowego o złożonej symptomatyce, znanego pod nazwą gnilca (szkorbutu), w którym niedobór witaminy C prowadzi do niestabilności kolagenu (tab. Ia). Inne funkcje witaminy C, jako kofaktora enzymów, przedstawiono w tabeli Ib.

* Równoważnik – ilość substancji w reakcji chemicznej równoważnej 1,08 g wodoru lub 8 g tlenu; w reakcjach redox równoważnik obliczamy dzieląc masę cząsteczkową przez liczbę elektronów przyjmowanych/oddawanych w reakcji.

Tabela Ia. Rola witaminy C w gnilcu (na podstawie: 18, 89, 100, 113, 123, 125).

Funkcje związane z zapobieganiem rozwojowi szkorbutu
1. Kofaktor dla dioksygenaz (w hydrokslacji proliny i lizyny) witamina C jest potrzebna dla intensyfikacji aktywności tych enzymów w biosyntezie i stabilizacji heliksów kolagenu. Niedobór witaminy C prowadzi do utraty stabilności struktury kolagenu, co powoduje utratę uzębienia, bóle stawów, zaburzenia struktury tkanki kostnej i tkanki łącznej, upośledzone gojenie ran – charakterystycznych dla gnilca (szkorbutu).
2. Kofaktor dla dioksygenaz potrzebnych dla aktywności tych enzymów w biosyntezie karnityny. Karnityna jest niezbędnym elementem transportującym aktywowane kwasy tłuszczowe do mitochondriów – jej niedobór charakteryzuje się osłabieniem i ospałością – wczesne objawy szkorbutu.
3. Kofaktor w biosyntezie katecholamin – B-monooksygenazy dopaminy – katalizuje proces hydroksylacji dopaminy w konwersji do norepinefryny. W szkorbucie pojawia się depresja, hipochondria oraz zmiany nastroju.

Tabela Ib. Zbiorcze zestawienie roli witaminy C w ustroju (na podstawie: 18, 43, 61, 89, 100, 113, 123, 125).

Inne funkcje witaminy C jako kofaktora enzymów
1. Udział w metabolizmie tyrozyny.
2. Udział w biosyntezie steroidów w korze nadnerczy oraz biosyntezie adrenaliny z tyrozyny.
3. Udział w metabolizmie cholesterolu: jest kofaktorem 7 alfa-monooksygenazy- enzymu katalizującego przekształcenie cholesterolu w kwasy żółciowe.
4. Działanie antykancerogenne - hydroksylacja przez wątrobowy cytochrom P-450 aromatycznych leków. Efekt antykancerogenny jest potęgowany przez czynniki redukujące, takie jak witamina C, co hamuje powstawanie nitrozoamin.
5. Redukcja aktywnego centrum, w skład którego wchodzą jony metali, mono– i dioksygenaz. W odróżnieniu od innych witamin rozpuszczalnych w wodzie, witamina C działa jako kofaktor, a nie jako koenzym. Zdolność do utrzymywania się w stanie zredukowanym związana jest z potencjałem oksy-redukcyjnym witaminy C.
6. Udział w mechanizmie wchłaniania żelaza: witamina C utrzymuje żelazo na +2 stopniu utleniania; w tej formie żelazo jest najlepiej wchłaniane z przewodu pokarmowego.

Prawidłowe stężenie kwasu askorbinowego w osoczu krwi człowieka wynosi 54 – 76 μmol/l (123), zalecane w podręczniku *Normy Żywienia Człowieka* – 49,97 – 60,19 μmol/l (16). Zapotrzebowanie wg RDA (*Recommended Dietary Allowance*) – zdefiniowane jako średni dzienny poziom spożycia, który wystarcza dla zapewnienia pełnego zapotrzebowania na składniki pokarmowe) dla witaminy C wynosi 60 mg/24 h dla niepalących osób dorosłych oraz zwiększa się o 20 - 40 mg/24 h w okresie ciąży i laktacji (wg zaleceń Rady ds. Żywności i Żywienia Narodowej Akademii Nauk USA z 1999 roku). RDA dla witaminy C określone było na podstawie dawek zapobiegających niedoborowi, wskaźnika obrotu oraz wskaźnika puli początkowej witaminy C w organizmie człowieka. Pula początkowa dla witaminy C wynosi ok. 1500 mg, przy hipotetycznej absorpcji 85 % spożywanej dawki. Ilość ta zapewnia odpowiedni margines bezpieczeństwa. Przy stosowaniu diety ubogiej w witaminę C – dawka 60 mg witaminy C/dobę zapobiega wystąpieniu szkorbutu przez okres około 1 miesiąca. Dawka 100 mg/24 h jest również optymalna dla zmniejszenia ryzyka wystąpienia chorób przewlekłych, takich jak choroby nowotworowe, choroby układu sercowo-naczyniowego oraz zaćma (prawdopodobnie w wyniku zachowania potencjału antyoksydacyjnego) (12, 15, 25, 57, 71, 73, 90, 97, 99, 123, 131, 132, 150, 159, 174).

W roku 1999 Kallner i wsp. na podstawie badań izotopowych nad kinetyką przemian tej witaminy u zdrowych mężczyzn w wieku 20 – 45 lat, wykazali, że przy dziennym spożyciu 60 mg witaminy C przemianom metabolicznym ulega 40 – 50 mg, a przy całkowitej przemianie 60 mg stężenie witaminy C w osoczu wynosi 45,4 – 51,1 μmol/l, natomiast zapasy w ustroju – 20 mg/kg (80). Autorzy na podstawie wyników tych badań stwierdzili, że 100 mg kwasu askorbinowego pokrywa całkowicie fizjologiczne zapotrzebowanie 95 % zdrowej populacji (5, 18, 80, 99, 123, 150).

2.3. Witamina C a stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny można zdefiniować jako zaburzenie równowagi prooksydacyjno/antyoksydacyjnej na korzyść reakcji prooksydacyjnych. W sytuacji tej organizm znajduje się w stanie zwiększonej ekspozycji na związki utleniające, które powodują oksydatywne modyfikacje składników komórki. Wolnymi rodnikami są atomy, grupy atomów, cząsteczki lub ich fragmenty, naładowane lub obojętne, w których ostatni orbital zawiera jeden lub więcej niż jeden niesparowany elektron. Decyduje to o dużej reaktywności chemicznej i jednocześnie o nietrwałości wolnych rodników. Najczęściej wśród wolnych rodników wymienia się aktywne postacie tlenu. Posiadają one właściwości utleniające, jeżeli

pobierają elektrony, albo redukujące, jeżeli je oddają. Wśród związków tlenu często uczestniczących w powstawaniu wolnych rodników należy wymienić nadtlenek wodoru - H_2O_2. W warunkach zdrowia stężenie wolnych rodników tlenowych jest ściśle kontrolowane przez enzymatyczne i nieenzymatyczne układy antyoksydacyjne (25, 26, 76, 85, 96, 114, 116, 119, 120, 124, 162).

Do wolnych rodników należą między innymi:

- $O_2^{-\cdot}$ – anion ponadtlenkowy,
- NO – tlenek azotu,
- $OH^{\cdot}$ – rodnik hydroksylowy.

Do antyoksydantów enzymatycznych zalicza się:

- dysmutazę ponadtlenkową (SOD),
- peroksydazę glutationową (GSH-Px),
- katalazę (CAT).

Do nieenzymatycznych antyoksydantów, które mogą reagować z aktywnymi związkami tlenu i niektórymi rodnikami, mogącymi podlegać zużyciu, bądź regeneracji, zalicza się:

- witaminy – A, C, E, K,
- glutation,
- bilirubinę,
- kwas moczowy,
- koenzym Q,
- ferrytynę,
- ceruloplazminę,
- albuminę,
- penicylaminę.

Reaktywne związki tlenu charakteryzują się zdolnością uczestniczenia w wielu reakcjach chemicznych, ich okres półtrwania mierzony jest w sekundach. Oznaczanie ich obecności *in vivo* jest trudno wykonalne. W przeciwieństwie, lipidy, węglowodany, białka i kwasy nukleinowe po modyfikacji przez aktywne związki tlenu tworzą produkty, których okresy półtrwania wynoszą od godzin do tygodni, co umożliwia ich wykorzystanie jako pośrednich markerów stresu oksydacyjnego (p. tab. II).

Tabela II. Markery stresu oksydacyjnego (na podstawie 175)

Typ reakcji chemicznej	**Markery**
Peroksydacja lipidów	Akroleina
	Dialdehyd malonylowy (MDA)
	4-hydroxynonenal
	Inne aldehydy reagujące z kwasem tiobarbiturowym
	F_2-izoprostany
	Produkty końcowe oksydacji lipidów (***advanced lipid oxidation products*** **– ALOP)**
	Przeciwciała przeciwko utlenionym LDL (***oxidized LDL antibodies*** **– OLDLA)**
Peroksydacja białek	Późne produkty oksydacji białek (***advanced oxidation products*** **– AOPP)**
Oksydacja węglowodanów	Końcowe produkty glikacji (***advanced glycosylation end-products*** **– AGE's)**
Oksydacja kwasów nukleinowych	8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna

Zaburzenie równowagi pomiędzy stanem prooksydacyjnym a antyoksydacyjnym – w wyniku nadprodukcji reaktywnych związków tlenu, ich pochodnych wolnych rodników albo w wyniku osłabienia działania antyoksydacyjnego systemów prowadzi do wystąpienie efektów toksycznego działania wolnych rodników tlenowych. Związkami szczególnie narażonymi na działanie wolnych rodników tlenowych (głównie rodnika hydroksylowego) są wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Działanie rodnika hydroksylowego na te związki powoduje powstanie nadtlenków lipidów. Peroksydacja lipidów ma charakter lawinowy i raz zapoczątkowana przebiega aż do wyczerpania substratu. Wolne rodniki tlenowe działając na lipidy błon komórkowych naruszają dwuwarstwową strukturę błony, prowadząc do zmiany jej płynności, wzrostu przepuszczalności oraz utraty jej integralności. Ostatecznie proces ten może prowadzić do uwolnienia enzymów lizosomalnych i śmierci komórki. Proces ten jest

prawdopodobnie głównym mechanizmem wolnorodnikowego uszkodzenia tkanek (2, 19, 21, 25, 120, 124, 183).

Witamina C jest jednym z elementów składowych fizjologicznej bariery antyoksydacyjnej, której zadaniem jest redukowanie związków silnie utleniających, powstających w organizmie w wyniku działanie układu błonowej oksydazy $NADP^+$ neutrofilów i monocytów (67). Witamina ta jest konieczna również do redukcji produktów ubocznych utleniania glukozy w cyklu kwasów trójkarboksylowych w mitochondriach. Mitochondrialny łańcuch oddechowy jest największym źródłem utleniaczy w organizmie człowieka.

Powstawanie utleniaczy w fagocytach polega na produkcji reaktywnych związków tlenowych poprzez reakcję jednowartościowej redukcji tlenu cząsteczkowego (O_2) w następstwie ekspozycji na odpowiednie bodźce (84). Zarówno neutrofile, jak i monocyty-makrofagi produkują i uwalniają do przestrzeni pozakomórkowej $O_2^{-\cdot}$ w reakcji tzw. "wybuchu oddechowego (*respiratory burst*) ". Zespół enzymów oksydazy NADPH, który jest związany z błonami komórkowymi, redukuje cząsteczki O_2 do anionorodnika ponadtlenkowego $O_2^{-\cdot}$. Jest to związek nietrwały i natychmiast przekształcany w nadtlenek wodoru (H_2O_2) z udziałem enzymu dysmutazy ponadtlenkowej (25, 96, 120).

$$2\,O_2 + NADPH \xrightarrow{\text{oksydaza NADPH}} \underset{\text{anionorodnik ponadtlenkowy}}{2\,O_2^{-\cdot}} + NADP^+ + H^+$$

$$2\,O_2^{-\cdot} + H_2^+ \xrightarrow{\text{dysmutaza ponadtlenkowa}} \underset{\text{nadtlenek wodoru}}{H_2O_2} + O_2$$

Zarówno $O_2^{-\cdot}$ jak i H_2O_2 są prekursorami używanymi do syntezy silniejszych utleniaczy. $O_2^{-\cdot}$ reaguje z tlenkiem azotu NO tworząc wysoce reaktywny nadtlenoazotyn. Ponadto anionorodnik ponadtlenkowy może jednoelektronowo redukować jony metali przejściowych znajdujące się na wyższych stopniach utlenienia (Fe^{+3} do Fe^{+2}, Cu^{+2} do Cu^+) (96, 120).

$$O_2^{-\cdot} + Fe^{+3} \longrightarrow O_2 + Fe^{+2}$$

Duże ilości nadtlenku wodoru H_2O_2 produkują neutrofile. Nadtlenek wodoru jest substratem dla mieloperoksydazy, enzymu będącego ważnym komponentem układu zabijającego bakterie (120). Nadtlenek wodoru reaguje ponadto z wewnątrzkomórkowym żelazem

tworząc rodniki hydroksylowe $OH^{\cdot}$, które biorą intensywny udział w degradacji lipidów błony komórkowej, agregacji białek i uszkadzaniu DNA. Źródłem rodnika hydroksylowego w systemach biologicznych są dwie reakcje. Pierwsza zachodzi pomiędzy anionorodnikiem ponadtlenkowym i nadtlenkiem wodoru (tzw. reakcja Habera-Weissa) (25, 96, 120, 126):

$$O_2^{-\cdot} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + O_2$$

W środowisku biologicznym zawierającym katalazę i dysmutazę ponadtlenkową (enzymy usuwające substraty dla reakcji Habera-Weissa) nie odgrywa ona jednak większej roli, jako źródło rodnika hydroksylowego w komórkach. Druga reakcja (tzw. reakcja Fentona) zachodzi pomiędzy jonem żelazawym (Fe^{+2}) i nadtlenkiem wodoru. Jest ona głównym źródłem rodnika hydroksylowego w komórkach (120, 126).

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

Mechanizm powstawania rodnika hydroksylowego w reakcji Fentona zakłada istnienie cyklu dwóch reakcji. Pierwszą z nich jest właściwa reakcja Fentona. Drugą – reakcja regenerująca jon żelazawy drogą redukcji jonu żelazowego, powstającego podczas pierwszej reakcji, przez anionorodnik ponadtlenkowy (120, 126).

$$O_2^{-\cdot} + Fe^{+3} \rightarrow O_2 + Fe^{+2}$$

Istnieją przekonujące dowody, że rodniki hydroksylowe produkowane zarówno w reakcji Fentona, jak i w reakcji Habera-Weissa (katalizowanej żelazem) są odpowiedzialne za toksyczne działanie żelaza w organizmie (126).

Rodnik hydroksylowy ($OH^{\cdot}$) utlenia lipidy, uszkadza białka, kwasy tłuszczowe i kwasy nukleinowe. Z tego powodu działanie bariery antyoksydacyjnej (enzymatycznej oraz nieenzymatycznej) polega na usuwaniu z środowiska wewnętrznego organizmu $OH^{\cdot}$ i H_2O_2, aby nie dopuścić do dalszego tworzenia silnych utleniaczy (25, 96, 120). Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) – około 1000-krotnie przyśpiesza proces dysmutacji $O_2^{-\cdot}$ do H_2O_2, działając jako pierwsza linia obrony enzymatycznej przeciwutleniaczowej. Katalaza – rozkłada H_2O_2 do tlenu cząsteczkowego O_2 i wody. Peroksydaza glutationu zawierająca selen (GSH-Px) z udziałem GSH jako donora wodoru redukuje wszystkie organiczne nadtlenki

lipidowe (25, 96). Najważniejszym nieorganicznym antyoksydantem jest glutation (GSH), który jest akceptorem H_2O_2, $OH^{\cdot}$ i utleniających związków chloru.
Zadaniem witaminy E (nieenzymatyczny antyoksydant) jest ochrona błony komórkowej przed peroksydacją lipidów poprzez tworzenie niskoreaktywnego rodnika tokoferoksylowego. Witamina C bezpośrednio redukuje rodniki $O_2^{-\cdot}$ i $OH^{\cdot}$. Również białka ostrej fazy uczestniczące w procesach zapalnych, takie jak ferrytyna, transferyna i albumina wykazują nieenzymatyczne działanie antyoksydacyjne zarówno przez sekwestrację jonów metali przejściowych jak i poprzez redukujące działanie własnych grup –SH (25, 96).

Ocena stanu antyoksydacyjnego chorych z przewlekłą niewydolnością nerek polega na pomiarze stężeń lub wykazaniu obecności różnych składowych układu antyoksydacyjnego w osoczu i komórkach. Pomimo braku standardów oraz sprzecznych wyników, u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek udało się wykazać niedobór czynników antyoksydacyjnych poprzez oznaczenie w osoczu stężenia witaminy C i aktywności GSH-Px oraz zawartości w erytrocytach SOD, GSH, GSH-Px i witaminy E (96).

2.4. Witamina C a hemodializa

Stres oksydacyjny, zdefiniowany jako zaburzenie równowagi między reaktywnymi związkami tlenowymi (ROS) a mechanizmami obrony antyoksydacyjnej, jest obecnie dobrze znaną negatywną reakcją występującą u pacjentów hemodializowanych (21, 119, 121). Stanowi on istotny czynnik ryzyka rozwoju takich stanów chorobowych jak skrobiawica (amyloidoza), choroby sercowo-naczyniowe, miażdżyca tętnic oraz – w wyniku powstających reaktywnych form tlenu – może też brać udział w aktywacji protoonkogenów do onkogenów, przyczyniając się do rozwoju chorób nowotworowych (45, 64, 121, 154).

Jedną z metod pozwalających na skuteczne leczenie chorych z SNN jest hemodializa. Polega ona na usuwaniu toksyn mocznicowych, gromadzących się w okresie między kolejnymi dializami, wyrównywaniu powstających zaburzeń elektrolitowych, wyrównywaniu kwasicy metabolicznej oraz usuwaniu nadmiaru wody z organizmu w wyniku ultrafiltracji (149).
Zabieg HD polega na wymianie drobnocząsteczkowych substancji rozpuszczonych w wodzie, pomiędzy krwią (a ściślej mówiąc: wodą osocza krwi) pacjenta a płynem dializacyjnym. Wodę osocza chorego przedziela od płynu dializacyjnego półprzepuszczalna błona, przez którą na drodze dyfuzji i/lub konwekcji zachodzi proces wymiany. Skład płynu dializacyjnego (dializatu) zbliżony jest do składu osocza zdrowego człowieka. O skuteczności zabiegu

decyduje wiele elementów ale kluczową rolę odgrywa przepuszczalność błony dializacyjnej opisana wartością współczynnika KoA (*overall mass transfer coefficient*) (149, 154, 184).

Drugim z mechanizmów transportu substancji rozpuszczonych przez błonę półprzepuszczalną kapilar dializatora jest konwekcja. Ponieważ cząsteczki wody są bardzo małe i swobodnie przechodzą przez błony półprzepuszczalne, ciśnienie hydrostatyczne **(**lub osmotyczne**)** może określać kierunek przechodzenia wody przez błonę półprzepuszczalną**,** w ilości zależnej od ich wartości. Większe cząsteczki substancji rozpuszczonych, których rozmiary przewyższają wielkości kanałów filtracyjnych błony, będą zatrzymane i nie będą przez nią przechodziły (149, 154).

Dializator zawiera około 10000 – 15000 pojedynczych kapilar. Efektywna powierzchnia wymiany w kapilarach wynosi średnio od 0,8 do 2 m^2, a wielkość porów około 200 nm. Szybkość przepływu krwi przez dializator wynosi średnio od 200 do 300 ml/min., a za standard przepływu płynu dializacyjnego przyjęto 500 ml/min. W ciągu roku, krew chorego przepływająca przez dializator kontaktuje się z około 18 – 23 tysiącami litrów płynu dializacyjnego. Pacjenci hemodializowani przez okres kilki lat trwania leczenia kontaktują się z większą ilością wody niż osobnicy z populacji zdrowych ludzi przez całe swoje życie (154). Może to mieć pewne negatywne następstwa.

2.5. Stężenia witaminy C u chorych hemodializowanych

Chorzy leczeni dializą pozaustrojową stanowią szczególną grupę osób, których leukocyty stykają się z błoną dializacyjną, co powoduje ich pobudzenie i produkcję anionów OH^- i H_2O_2 narażając ich na dodatkowy stres oksydacyjny (21). Wymienione reaktywne związki tlenowe mogą zostać użyte jako markery biozgodności błon dializacyjnych (72). Bioniezgodność błon prowadzi między innymi do niekontrolowanej reakcji oksydatywnego uszkodzenia lipidów, białek i innych związków biologicznie czynnych u chorych dializowanych (21, 72). Zwiększona synteza utleniaczy powoduje również częściowe zużycie substancji tworzących barierę antyoksydacyjną. Szczególną rolę odgrywa w tej grupie witamina C, która jako rozpuszczalna w wodzie jest narażona na kontakt z oksydantami produkowanymi przez aktywowane neutrofile (120).

Stres oksydacyjny u chorych hemodializowanych może być wytłumaczony zarówno przez wzrost syntezy ROS, jak i przez zmniejszenie mechanizmów obronnych w tej populacji. Z uwagi na zaburzenie równowagi pomiędzy układem pro- i antyoksydacyjnym, wskaźniki stresu antyoksydacyjnego ulegają zwiększeniu podczas zabiegu hemodializy u pacjentów z

SNN. Zostało to wykazane za pomocą chemoluminescencji pełnej krwi, gdzie w trakcie zabiegu hemodializy stwierdzono bezpośredni wzrost stężenia ROS we krwi (96). Na zwiększoną aktywność prooksydatywą pacjentów z chorobą nerek wpływ mają, takie czynniki jak zaawansowany wiek i cukrzyca, mocznica, przewlekłe stany zapalne oraz czynniki związane z terapią nerkozastępczą (96). Okresowa styczność krwi z układem dializacyjnym przyczynia się do nadprodukcji ROS przez fagocyty, co stanowi znaczący dowód na niezgodność między krwią a błoną dializacyjną. Zjawisko to może być w głównej mierze zależne od właściwości błony oraz od ewentualnej obecności endotoksyn zanieczyszczających dializat (116, 141, 185). Reakcje pro-zapalne w odpowiedzi na niezgodność między krwią a błoną dializacyjną, odgrywają istotną rolę w produkcji wolnych rodników tlenowych przyczyniających się do pogorszenia stanu prooksydatywnego pacjentów z mocznicą (117, 141, 185). Czynnikami, które przyczyniają się do stymulacji NADPH-oksydazy są chemoreaktywność błony i śladowe ilości endotoksyn. Układ antyoksydacyjny u chorych z mocznicą jest znacznie upośledzony i wolno modyfikowany w zależności od stopnia niewydolności nerek. HD może dodatkowo doprowadzić do uszkodzenia układu antyoksydacyjnego głównie poprzez utratę (96):

a. niezwiązanych, hydrofilnych związków o niskiej masie cząsteczkowej, takich jak np. witaminy,
b. pierwiastków śladowych,
c. kofaktorów regulujących aktywność enzymów.

U pacjentów hemodializowanych zmianie ulegają również niektóre z mechanizmów obrony antyoksydatywnej: redukcja Cu/Zn dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w erytrocytach oraz zmniejszenie aktywności peroksydazy glutationu (GSH-Px) w osoczu (64, 116). U chorych z mocznicą dochodzi również do zmian stężeń antyoksydacyjnych witamin rozpuszczalnych w wodzie. Stężenie witaminy E w erytrocytach i komórkach jednojądrzastych jest niskie, mimo prawidłowego jej stężenia w osoczu. Obserwuje się również znaczne obniżenie stężenia witaminy C w osoczu chorych dializowanych (3, 4, 20, 109, 116,).

Równocześnie z stwierdzaną utratą witaminy C, wykazano obecność zjawiska stresu oksydacyjnego w populacji hemodializowanej poprzez zaobserwowanie wzrostu stężenia dialdehydu malonylowego (MDA) (1,66 ± 0,27 μmol w trakcie HD vs. 0,89 ± 0,25 μmol u zdrowych uczestników badania; $p < 0,01$) oraz stężenia złożonych produktów oksydacji białek AOPP (77,5 ± 29,3 μmol w trakcie HD vs. 23,5 ± 13,3 μmol u zdrowych uczestników badania; $p < 0,01$) (116). Nie zaobserwowano natomiast zmian w stężeniu witaminy E w osoczu u obu analizowanych populacjach (116). Na podstawie innych badań w sposób jednoznaczny

zidentyfikowano również pozostałe markery stresu oksydacyjnego, takie jak pochodne oksydacji lipidów – MDA (72, 121, 183), końcowe produkty utleniania białek – AOPP oraz końcowe produkty glikacji – AGEs (96, 114). Tworzenie AGEs poprzedzone jest stresem oksydacyjnym niezależnie od stężeń glukozy. Prawidłowe związki białkowe zostają zmodyfikowane poprzez nieenzymatyczną reakcję Maillarda, łączącą grupy aminowe białek z glukozo-pochodnymi grupami aldehydowymi doprowadzając do powstania złożonych produktów końcowych glikacji w czasie trwającym miesiące. Ilość białek zmodyfikowanych przez AGEs ulega zwiększeniu wraz ze starzeniem się i uważa się je za element odpowiedzialny za tzw. remodelling prawidłowych tkanek. U osób z cukrzycą poziom AGE's zwiększa się znamiennie, jako wynik utrzymującej się hiperglikemii, prowadząc do uszkodzenia tkanek wskutek różnych mechanizmów. Ostatnio prowadzone badania wykazały znaczący wzrost poziomu końcowych produktów glikacji w osoczu, skórze i fibrylach amyloidu u chorych hemodializowanych (114, 121, 151). W amyloidozie podializacyjnej stwierdzono obecność dwóch markerów AGE, tj. N^{ε}-karboksymetyl-lizyny (CML) i pentozydyny. U chorych z mocznicą podwyższone stężenie glukozy nie jest odpowiedzialne za akumulację AGE (114).

Tworzenie CML i pentozydyny jest ściśle związane z procesami oksydatywnymi. Badanie przeprowadzone przez Miyatę i wsp. potwierdziło teorię tworzenia się AGE u pacjentów hemodializowanych przez procesy zależne od stresu oksydacyjnego (114). Badania zmian stężenia kwasu askorbinowego, wskazywały, że ulega on łatwo utlenianiu podczas stresu oksydacyjnego a jego utleniona forma (oxiAA) jest źródłem CML i pentozydyny (114). Inkubacja *in vitro* β2-mikroglobuliny (β_2m) i kwasu askorbinowego przy udziale tlenu atmosferycznego doprowadziła do szybkiego pojawienia się związków o właściwościach typowych dla AGE, przyśpieszenia tworzenia się CML w β_2m i β_2m-peptydzie, co wykazano za pomocą spektrometrii masowej. Podobnie inkubacja *in vitro* albuminy osocza ludzkiego ujawniła tworzenie pentozydyny, której obecność stwierdzono za pomocą HPLC. U pacjentów hemodializowanych stosunek kwasu oksyaskorbinowego do całkowitego poziomu kwasu askorbinowego był dwukrotnie wyższy w porównaniu do osób zdrowych (0,87 ± 0,16 vs. 0,35 ± 0,11, $p < 0,0001$) sugerując obecność nasilonego stresu oksydacyjnego. Stężenie oxiAA w osoczu było skorelowane z poziomem pentozydyny związanej z białkami ($p < 0,01$, $r^2 = 0,25$) i wolnej ($p < 0,05$, $r^2 = 0,22$). Wyniki te wskazują, że w czasie stresu oksydacyjnego, nawet przy braku obecności glukozy, tworzenie AGE (CML i pentozydyny) jest zwiększone. Powyższe wyniki sugerują, że produkcja CML i pentozydyny w mocznicy zależna jest zarówno od zwiększonego stresu oksydacyjnego jak i od dostępności prekursorów, np. oxiAA (114).

Huang i wsp. wykazali, że jeśli nie dojdzie do wyczerpania zapasów witaminy C, zmiany oksydacyjne nie mają istotnego wpływu na stężenie witaminy E. Co więcej, efekt ten występuje wyłącznie wówczas, gdy enzymatyczne systemy ochronne są przeciążone. Wolne rodniki tlenowe atakują wielonienasycone kwasy tłuszczowe (bezpośredni substrat wolnych rodników tlenowych), co prowadzi do peroksydacji lipidów i produkcji dialdehydu malonylowego (71). MDA może być używany jako wskaźnik uszkodzenia błony komórkowej (71, 121). W badaniu Hultvista i wsp. stężenia witaminy E w osoczu podczas hemodializy pozostawały niezmienione, co wskazywało na niewielkie zużycie tego antyoksydantu (72). Rocco i wsp., stwierdzili, że stężenia witaminy E w osoczu u pacjentów przewlekle dializowanych nie różnią się statystycznie od poziomów u grupy kontrolnej (62, 133). Istnieją jednak doniesienia o niskim poziomie witaminy E w erytrocytach pacjentów przewlekle hemodializowanych, co można korygować suplementacją z zewnątrz. Jeśli pacjentów hemodializowanych zabezpieczy się dawką 300 mg/dobę witaminy E przez 15 dni, dochodzi do poprawy osmotycznej wrażliwości erytrocytów i zmniejszenia oksydatywnego uszkodzenia obwodowych komórek jednojądrzastych (62, 133).

Witamina E i witamina C oraz ich połączenie były stosowane do łagodzenia kurczy mięśni i świądu podczas leczenia dializą. Kurcze mięśni (zmniejszające się po terapii karnityną lub witaminą C) są częstym zjawiskiem u chorych hemodializowanych. Ponieważ witamina C uczestniczy w biosyntezie karnityny i – jak dowiedziono – ich stężenia u chorych z mocznicą są obniżone, subkliniczny niedobór witaminy C może przyczyniać się do kurczy mięśniowych podczas zabiegów hemodializ (62, 87, 133). Khajehdehi i wsp. (87) przedstawili wyniki badania z użyciem placebo, podwójnie ślepą próbą i z udziałem 60 pacjentów hemodializowanych. Każda z grup (n = 15) otrzymywała 6 identycznych kapsułek dziennie przez okres 8 tygodni, zawierających odpowiednio: witaminę E (400 mg) lub witaminę C (250 mg), ich kombinację, względnie placebo. Pod koniec badania witamina E, witamina C, ich połączenie lub placebo spowodowały zmniejszenie kurczy o odpowiednio 54, 61, 97 i 7 %. Procent redukcji częstości występowania kurczy mięśni nie miał związku z wiekiem, płcią, etiologią SNN, stężeniem elektrolitów osocza, czasem trwania dializy, lecz wskazywał na pozytywną korelację z rodzajem stosowanego leczenia ($r = 0,33$, $p = 0,01$). Nie odnotowano żadnych działań niepożądanych związanych z przyjmowaniem witamin (87). Wyniki te wskazują na efektywność i bezpieczeństwo krótkotrwałej terapii skojarzonej witaminą E i C w zapobieganiu kurczom mięśni u pacjentów hemodializowanych. Na obecnym etapie nie oceniono bezpieczeństwa przewlekłej terapii w/w witaminami u pacjentów hemodializowanych. Mając na uwadze prawidłowe lub podwyższone stężenia witaminy E

obserwowane u pacjentów dializowanych, istnieje potencjalne ryzyko przedawkowania bądź nieprawidłowego przyjmowania leku. Wydaje się, że stała suplementacja witaminy E nie jest konieczna u pacjentów hemodializowanych (62, 72, 108, 133).

Obecnie nową techniką hemodializacyjną nastawioną na redukowanie stresu oksydacyjnego i usuwanie hydrofobowych lub związanych z białkami toksyn jest tzw. hemolipodializa. Technika ta obejmuje stosowanie dializatu zawierającego kwas askorbinowy i wielonienasycone, jednoliniowe liposomy zawierające tokoferol (witaminę E). Liposomy oddziaływają na składniki krwi przy błonie dializacyjnej, nie przechodząc przez błonę. Witamina E i witamina C są dodane do układu, by ochraniać komórki i składniki osocza przed reaktywnymi związkami tlenu produkowanymi przez aktywowane komórki zapalne. Technika ta stanowi nowe podejście do zapobiegania skutkom działania wolnych rodników u pacjentów przewlekle dializowanych (179). Udoskonalono również kapilary dializatorów celem zminimalizowania bioniezgodności błony, która powodowała zwiększone wytwarzanie wolnych rodników przez układ dopełniacza aktywowany błoną dializacyjną i pobudzone leukocyty. Ostatnio proponuje się stosowanie błony dializacyjnej typu *high-flux* powlekanej witaminą E (CL-EE) (12). Istnieją dane dotyczące prowadzonych *in vivo* badań z udziałem błony pokrytej witaminą E. Bonnefont-Rousselot i wsp. (12) badali wpływ 3-miesięcznego stosowania błony dializacyjnej CL-EE, porównując ją do konwencjonalnych błon. Głównym zaobserwowanym efektem było znamienne zwiększenie HDL w osoczu i witaminy E, co stanowiło niewątpliwą korzyść u chorych dializowanych na błonach CL-EE, ze względu na mniejszą skłonnością do oksydacji HDL (*high density lipoproteins*). Teoria oksydacyjna rozwoju miażdżycy przypisuje lipoproteinom HDL nowe, zapobiegające jej rozwojowi działanie. Rola stresu oksydacyjnego w miażdżycy związana jest z hamowaniem biosyntezy prostacykliny PGI_2 oraz z hamowaniem uwalniania NO ze śródbłonka. Brak działania przeciwmiażdżycowego autakoidów śródbłonka przyśpiesza procesy miażdżycowe. Nadmierne wytwarzanie reaktywnych form tlenu modyfikuje oksydatywnie lipoproteiny o małej gęstości (LDL - *low density lipoprotein*). Zmodyfikowane LDL mogą być usuwane przez receptory LRP (*LDL – related protein*) hepatocyta albo przez proces fagocytozy (drogą tzw. "*scavenger receptor*" – receptora wymiatającego) makrofagów lub zmodyfikowanej komórki ściany naczyń, co prowadzi do powstania komórek piankowatych (głównego budulca blaszki miażdżycowej) (22, 23, 29, 57, 65, 88, 121, 150). Wzmocnienie pojemności antyoksydacyjnej HDL przy udziale błon CL-EE ma istotne znaczenie z uwagi na wzrost roli ochraniającej LDL przed oksydacją oraz dalszym pozyskiwaniem HDL, które są bardziej oporne na utlenianie (12).

Omawiając problem suplementacji witamin u chorych hemodializowanych nie wolno zapominać o innych witaminach rozpuszczalnych w wodzie z grupy witamin B, takich jak witamina B_6, witamina B_{12} oraz kwas foliowy. Nowe badania sugerują, że witaminy te mogą być potrzebne w większej niż obecnie zalecanej ilości zarówno dla całej populacji, jak również dla osób z chorobami nerek (44, 53, 133, 182). Wiąże się to ze zwiększonym ryzykiem rozwoju zmian miażdżycowych w naczyniach wieńcowych, mózgowych, obwodowych i chorobą zakrzepową naczyń z powodu hiperhomocysteinemii (15, 24, 35, 63, 68, 74, 93, 121, 166, 177).

Homocysteina jest niezbędnym aminokwasem powstającym w procesie konwersji metioniny dostarczonej z pożywieniem lub powstającej w wyniku rozpadu endogennych białek do cysteiny (113). Hiperhomocysteinemia uważana jest obecnie za niezależny czynnik ryzyka rozwoju choroby niedokrwiennej serca, powikłań naczyniowych i nadciśnienia tętniczego. Stężenie homocysteiny jest zależne od stężenia witamin B_6, B_{12},i kwasu foliowego, a także prawidłowej aktywności enzymu – reduktazy metylenotetrahydrofolianowej. Enzym ten bierze udział w równolegle przebiegających procesach remetylacji i transsulfuracji metioniny i homocysteiny. Mechanizmy aterogennego działania homocysteiny polegają na cytotoksycznym uszkodzeniu śródbłonka naczyniowego, zwiększonej degradacji elastyny w błonie wewnętrznej (co przyspiesza procesy włóknienia i kalcyfikacji) oraz wpływaniu na czynniki krzepnięcia, fibrynolizy i agregację płytek, co prowadzi do zwiększenia ryzyka zakrzepicy żył głębokich (15, 24, 35, 63, 68, 74, 93, 166, 177). Hiperhomocysteinemia występuje u 85 – 100 % chorych hemodializowanych, w porównaniu do 3 – 7 % w populacji ogólnej. Stężenie homocysteiny wzrasta wraz z progresją niewydolności nerek. Stężenie homocysteiny powyżej 15 μmol/l jest uważane za podwyższone, do 30 μmol/l – określane jako łagodna hiperhomocysteinemia, do 100 μmol/l - jako umiarkowana. Za ciężką hiperhomocysteinemię uważa się stan, w którym jej stężenie w surowicy przekracza 100 μmol/l (wartości referencyjne: 5 – 15 μmol/l) (68, 93, 182). Ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych wzrasta o 1 % na każdy dodatkowy 1 μmol/l wzrostu stężenia homocysteiny w surowicy pacjenta hemodializowanego (74, 93). W przebiegu przewlekłej niewydolności nerek prawdopodobną przyczyną zwiększonego stężenia homocysteiny w surowicy jest upośledzony metabolizm nerkowy i ogólnoustrojowy, spowodowany uszkadzającym wpływem toksyn mocznicowych na aktywność enzymów biorących udział w przemianach homocysteiny oraz niedobory lub obniżone stężenie kwasu foliowego i witamin z grupy B (które także mogą powodować zwiększenie oporności na leczenie rHuEPO). Wrodzone przyczyny hiperhomocysteinemii to homozygotyczny niedobór reduktazy 5, 10 – metylenotetrahydrofolianu. Nabytymi

przyczynami, prócz niedoborów witamin B_6, B_{12} i kwasu foliowego są także niedoczynność tarczycy, cukrzyca, palenie papierosów i niektóre leki (24, 74, 93).

Powyższe rozważania prowadzą wprost do pytania o optymalne dawkowanie witamin rozpuszczalnych w wodzie u chorych poddawanych leczeniu nerkozastępczemu. Na podstawie piśmiennictwa można odpowiedzieć, że w przypadku witaminy C jest to dawka 60 mg/dobę (62, 133). Zalecenia dotyczące suplementacji innych witamin u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek w okresie przeddializacyjnym, dializacyjnym i po przeszczepieniu nerek przedstawiono w tabeli XXXIII w Aneksie pracy (48, 62, 108, 133, 144, 145).

2.6. Witamina C a żelazo i erytropoetyna

2.6.1. Metabolizm żelaza

Żelazo jest istotnym mikroelementem organizmu, transportującym tlen do tkanek za pomocą hemoglobiny oraz działającym jako kofaktor wielu układów enzymatycznych (129, 169). Stanowi ono niezbędny składnik reakcji katalitycznych, oksydacyjno-redukcyjnych i bioenergetycznych. Z drugiej strony, właściwości chemiczne żelaza, które są przydatne dla różnych funkcji biologicznych, stanowią jednocześnie problem dla żywego organizmu. Dopóki nie zostanie ono właściwie „obudowane", odgrywa również kluczową rolę przy tworzeniu toksycznych rodników tlenowych, takich jak wysoce toksyczne rodniki w reakcji Habera-Weissa, mogące doprowadzać do peroksydatywnego uszkodzenia życiowo ważnych struktur, atakując wszelkie biologicznie czynne cząsteczki (169). Hemoproteiny (białka hemowe zwierające żelazo) biorą udział w istotnych biologicznie reakcjach, wliczając w to wiązanie tlenu (hemoglobina), metabolizm tlenu (oksydazy, peroksydazy, katalazy) oraz transport elektronów (cytochromy) (129, 169). Białka zawierające żelazo są niezbędnym składnikiem metabolizmu kolagenu, tyrozyny i katecholamin. Żelazo jest wydalane z organizmu w dwóch postaciach, Fe^{+2} i Fe^{+3}, które mogą odpowiednio oddawać, bądź przyjmować elektrony. W fizjologicznym pH, Fe^{+2} jest gotowe do przechodzenia w Fe^{+3}, co doprowadza w szybkim tempie do powstawania nierozpuszczalnych polimerów $Fe(OH)_3$ (129).

Żelazo, powiązane z ferrytyną i hemosyderyną jest magazynowane w komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby, śledziony i szpiku kostnego. Pula ta zawiera około 30% z 3 – 4 g całkowitego zapasu żelaza. Pozostała część znajduje się w tkance krwiotwórczej bądź w krążących krwinkach czerwonych. Większość żelaza jest przenoszona przez

transferynę, aczkolwiek dostępna jest jedynie pula 3 – 4 mg krążącego żelaza (tabela XXXIV w Aneksie pracy) (137).

Ilość spożywanego żelaza waha się od nieznacznej aż do 200 mg/dobę, zwłaszcza w przypadku suplementacji u chorych z SNN, lecz jedynie 1 – 2 % ulega wchłanianiu z przewodu pokarmowego. Wymiana żelaza między szpikiem kostnym, krążącymi krwinkami czerwonymi a układem siateczkowo-śródbłonkowym wynosi co najmniej 20 miligramów z dziennej dawki (169). Wchłaniane z przewodu pokarmowego żelazo transportowane jest do szpiku kostnego, komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego oraz do mioglobiny tkanki mięśniowej lub wątroby przy udziale białka transportowego – transferyny. Żelazo podawane dożylnie, zarówno w postaci preparatów krwinek czerwonych jak i związków żelaza (dekstranu żelaza, glukonianu żelazowego, cukrzanu żelazowego) ulega przetworzeniu w komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego, a następnie transportowane jest za pomocą jednej lub obu grup wiążących transferyny do szpiku kostnego i innych tkanek. Skłonność do oddawania żelaza związanego z transferyną do tkanek nienależących do układu krwiotwórczego zależy od aktywności szpiku kostnego oraz stopnia wysycenia transferyny (50). Rozkład zasobów żelaza w organizmie ludzkim przestawiono w tabeli XXXIV w Aneksie.

2.6.2. Transport i magazynowanie żelaza.

Ferrytyna i rozpuszczalny receptor dla transferyny (sTfR) należą do ważnych markerów metabolizmu żelaza (81). Transferyna transportuje żelazo między miejscem wchłaniania a magazynowania i zużytkowania. Pozyskuje go również z hemoglobiny, poddawanej degradacji przez makrofagi układu siateczkowo-śródbłonkowego. Starzejące się erytrocyty są fagocytowane przez makrofagi, które uwalniają żelazo z pierścienia protoporfirynowego, przy udziale oksydazy hemowej (129). Nie zidentyfikowano w pełni mechanizmu kontrolującego uwalnianie żelaza z makrofagów. Dostarczanie żelaza do komórek, w tym i do komórek nerki, odbywa się na zasadzie wiązania transferyny przez receptor dla transferyny na błonie komórkowej. Kompleksy tranferyna-receptor są następnie wchłaniane w mechanizmie endocytozy, a żelazo zostaje uwolnione przez proces endosomalnego zakwaszania. Receptor dla transferyny jest odpowiedzialny za regulowanie wchłaniania żelaza związanego z transferyną. Receptor ten znajduje się na błonie komórkowej komórek progenitorowych erytropoezy. Wykazano zwiększenie syntezy receptora dla transferyny przez komórki krwiotwórcze pod wpływem aktywacji erytropoezy, jak również

zmniejszonego dowozu żelaza do szpiku kostnego. Receptor dla transferyny może być uważany za marker adekwatnego dostarczania żelaza do szpiku kostnego (81, 161).

Przechowywanie żelaza i jego ponowne uwalnianie z komórek jest regulowane posttranskrypcyjnie przez białka regulatorowe 1 i 2 (*iron regulatory protein:* IRP-1 i IRP-2), zależne od poziomu stresu oksydacyjnego i tlenku azotu (137). W warunkach ograniczonej podaży żelaza IRP blokuje część wiążącą żelazo, stabilizując receptor transferynowy. W przypadku pełnej dostępności żelaza ma miejsce scenariusz odwrotny (129).

Ferrytyna jest głównym białkiem magazynującym żelazo. W warunkach fizjologicznych ferrytyna utrzymuje żelazo w formie rozpuszczalnej, nietoksycznej i biologicznie dostępnej. Ma ona zdolność do sekwestracji ogromnych ilości żelaza oraz odgrywa rolę bufora w przypadku zmiennego zapotrzebowania tkanek organizmu na żelazo (81). Każda ilość żelaza będąca w nadmiarze w stosunku do zapotrzebowania jest gromadzona przez ferrytynę w tkankach, częściowo w formie zagregowanej – jako hemosyderyna. Ferrytyna ma kształt sferyczny, w formie „muszli", w której zagłębieniu mogą zostać umieszczone stosunkowo duże ilości uwodnionego tlenku żelazowo-fosforanowego (81).

Większość rezerw żelaza znajduje się w komórkach układu makrofagowo-monocytarnego, zwłaszcza w śledzionie, wątrobie, szpiku kostnym i mięśniach szkieletowych. Żelazo zmagazynowane w tych miejscach może zostać przeniesione poprzez transferynę osoczową tam, gdzie jest potrzebne (81, 169).

Zakres stężeń żelaza w warunkach prawidłowych wynosi 12 – 27 μmol/l. Całkowita zdolność wiązania żelaza (miara stężenia transferyny) wynosi 44,8 – 73,4 μmol/l (180). Tak więc transferyna jest wysycona w około 1/3 żelazem (z czego około 10 % stanowi transferyna dwużelazowa). Całkowita pula żelaza w osoczu u zdrowych dorosłych (około 3 mg) pozostaje niezmieniona pomimo codziennego udziału w cyklach metabolicznych i jest niezależna od zmagazynowanego żelaza (ferrytyny i hemosyderyny), którego ilość wynosi od 350 mg u kobiet i do 900 mg u mężczyzn (129). Musi istnieć pewien mechanizm kontrolny, który gwarantuje, że ilość żelaza uwalnianego z magazynów odpowiada dokładnie ilości żelaza pobieranego przez tkanki, lecz natura tej regulacji nie została poznana. Zakres wartości stężeń ferrytyny u osobników zdrowych wynosi 15 – 300 μg/l (81, 180). U pacjentów z niedoborem żelaza, stężenie ferrytyny wynosi poniżej 12 μg/l. Zmniejszenie zapasów w układzie siateczkowo-śródbłonkowym jest jedyną przyczyną niskiego stężenia ferrytyny w surowicy. Jest to uzasadnienie do posługiwania się oznaczeniami stężenia ferrytyny w praktyce klinicznej (81).

Stan zapalny i choroby nowotworowe są związane ze znaczącym podwyższeniem stężeń ferrytyny w surowicy. Zmiana stężeń ferrytyny w surowicy w stanie zapalnym odbywa się równolegle ze wzrostem stężenia białek ostrej fazy: haptoglobiny i białka C-reaktywnego, sugerując, że ferrytyna należy również do markerów zapalnych. Stopień wzrostu stężenia ferrytyny zależny jest od stanu gospodarki żelazem u pacjenta. Z uwagi na zmianę stężeń ferrytyny, stan zapalny może wyzwolić fałszywy wzrost wartości ferrytyny, doprowadzając do normalizacji jej poziomu u pacjentów z rzeczywistym niedoborem żelaza. Czynnik ten nakłada ograniczenia na użyteczność oznaczania stężenia ferrytyny, jako markera niedoboru żelaza (81) (przykładowo - SNN), lecz stanowi najlepszy z dostępnych wskaźników opisujących stan zapasów żelaza przed włączeniem terapii ludzką rekombinowaną erytropoetyną (81).

Zapasy żelaza u zdrowych osobników wynoszą od 800 do 1200 mg (w zależności od masy ciała). Pierwotny nadmiar żelaza lub pierwotna hemochromatoza są wrodzonymi zaburzeniami polegającymi na nadmiernym wchłanianiu żelaza z przewodu pokarmowego, które w przebiegu lat doprowadza do nadmiernego gromadzenia się żelaza (20 – 40 g) w komórkach miąższowych, prowadząc do uszkodzenia wielu narządów: serca, wątroby, trzustki (50, 122). Hemosyderoza polega na wtórnym gromadzeniu nadmiaru żelaza, w pierwszym rzędzie w komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby, szpiku kostnego i śledziony, będącym skutkiem powtarzalnych infuzji żelaza pochodzącego z preparatów krwiopochodnych używanych do leczenia niedokrwistości. W hemosyderozie, występowanie żelaza ograniczone jest do komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego, bez cech uszkodzenia i niewydolności narządów (50). Hemochromatoza dotyczy nadmiaru żelaza w komórkach śródmiąższowych, który prowadzi do uszkodzenia i niewydolności narządu.

2.6.3. Niedobór żelaza/przeładowanie żelazem u pacjentów z niewydolnością nerek

Zrozumienie istoty transportu żelaza i jego wewnątrzustrojowej kinetyki jest ważne w odniesieniu do problemu "przeładowania żelazem". Ma to szczególne znaczenie w momencie rozpoczęcia terapii rHuEPO, która zmieniła rozumienie metabolizmu i dystrybucji żelaza u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek. Aby ocenić wpływ leczenia rHuEPO na nadmiar

żelaza u pacjentów z PNN, należy zrozumieć problem istnienia jego nadmiaru przed włączeniem leczenia. Nadmiar żelaza u pacjentów z PNN powszechnie obserwowano przed erą leczenia rHuEPO.

W momencie włączenia pacjentów nie leczonych rHuEPO do dializ, stwierdzano znacznego stopnia niedokrwistość (hematokryt 15 – 25%, hemoglobina 5 – 8 g/dl) (50). Naturalna progresja niedokrwistości wymuszała liczne przetoczenia krwi powodując stopniowe przesunięcie miejsc magazynowania żelaza pochodzącego z krwinek czerwonych w kierunku układu siateczkowo-śródbłonkowego. Jeśli nie doszło do utraty krwi, wówczas żelazo, będące wcześniej częścią masy czerwonokrwinkowej, ulega sekwestracji w układzie siateczkowo-śródbłonkowym, powodując podwyższenie stężenia ferrytyny nawet u tych pacjentów, którzy nie otrzymywali żelaza z zewnątrz. Niedokrwistość w przewlekłej niewydolności nerek wynika w pierwszej kolejności z niedostatecznej produkcji nerkowej erytropoetyny. Ostatnio stwierdzono, że erytropoetyna zwiększa syntezę receptora dla transferyny i jego ekspresję na powierzchni komórek erytrocytotwórczych poprzez aktywację białka regulatorowego dla żelaza, stabilizując w ten sposób mRNA receptora transferyny. Bez dostatecznej stymulacji tych komórek erytropoetyną, liczba receptorów dla transferyny na powierzchni jest zmniejszona, zwiększając w ten sposób powinowactwo dla żelaza przez tkanki spoza układu erytrocytotwórczego (50).

Na podstawie wyników badań *in vivo* z użyciem znakowanego ^{59}Fe podawanego pacjentom dializowanym, wykazano obecność jego wątrobowych depozytów podczas ograniczenia funkcji erytrocytotwórczej szpiku kostnego. Biopsje wątroby u tych chorych ujawniły obecność znakowanego żelaza zarówno w hepatocytach, jak i w komórkach Kupffera (komórki siateczkowo-śródbłonkowe wątroby). Z uwagi na utrzymującą się niedokrwistość konieczne było przetaczanie koncentratów krwinek czerwonych. Stopniowo, w miarę wzrostu liczby przetoczeń krwi oraz - gdy podaż żelaza przekraczała jego utratę - dochodziło do stopniowego zwiększenia saturacji transferyny i stężenia ferrytyny w surowicy. Przy wzroście saturacji transferyny żelazo było dostarczane we wzrastających ilościach do wątroby i tkanek śródmiąższowych innych narządów, wliczając w to serce, tarczycę i trzustkę. Prowadziło to do ewidentnego przeładowania tkanek żelazem, co wykazano w badaniach biopsyjnych szpiku kostnego, wątroby i w badaniach pośmiertnych (50). Część chorych wykazywała saturację transferyny i stężenia ferrytyny sięgające odpowiednio 80 % i 4000 ng/ml. Do powyższych zmian dochodziło nie u wszystkich pacjentów. Niektórzy pacjenci dializowani mieli dostateczną aktywność erytropoetyczną szpiku kostnego i nie wymagali przetoczeń preparatów czerwonokrwinkowych, nie dochodziło u nich również do „przecieku" nie

wbudowanego żelaza do wątroby. Niekiedy następowała spontaniczna poprawa parametrów erytropoezy, zwłaszcza, gdy unikano przetoczeń krwinek czerwonych. Przetaczanie preparatów krwinek czerwonych u tych chorych powodowało supresję syntezy i tak resztkowych ilości nerkowej erytropoetyny, która była jeszcze produkowana. Poprawa erytropoezy powodowała stopniowe obniżanie się stężenia żelaza wskutek wyeliminowania przetoczeń krwinek czerwonych, które były związane z przewlekłą utratą krwi w trakcie zabiegu hemodializy (122, 163). Przed zastosowaniem leczenia rHuEPO stosowano praktykę sporadycznego przetaczania. Wyjątkiem były sytuacje objawowego niedotlenienia tkanek. Większość pacjentów bez dusznicy bolesnej, mogła stopniowo przystosować się do hematokrytu w granicach 22 – 28 % i nie wymagała suplementacji preparatów krwinek czerwonych, chociaż ich siły witalne oraz jakość życia były znamiennie zmniejszone (50). Niemniej jednak, chociaż utrata żelaza (krwi) związana z hemodializami była dość częstym zjawiskiem, nie kompensowała ona ilości żelaza uzyskiwanego z przetoczeń krwinek czerwonych. Dlatego też stopień nadmiaru żelaza utrzymywał się na stałym poziomie. Próby zmniejszenia przeładowania żelazem przy pomocy desferoksaminy w pierwszej kolejności były skuteczne u tych pacjentów, którzy nie wymagali dalszych przetoczeń krwi (27, 31). Jednakże u większości pacjentów ilość żelaza chelatowanego oraz przenoszonego przez błonę dializacyjną była mniejsza od ilości żelaza otrzymywanego dożylnie przez powtarzające się przetoczenia. Nadmiar żelaza wynikał również z nadmiernej podaży parenteralnej żelaza. Większość badań nad przeładowaniem żelazem u pacjentów dializowanych prowadzono u chorych, którzy otrzymywali zarówno żelazo parenteralnie, jak i transfuzje krwi. Różnicowanie między żelazem podawanym parenteralnie a żelazem pozyskanym z przetoczeń krwi może mieć krytyczne znaczenie dla wielu badań, w których oceniono gospodarkę tym mikroelementem.

Hemosyderoza związana z przeładowaniem żelazem wtórnym do przetoczeń krwi może być powikłana obecnością wirusowego zapalenia wątroby typu B lub C nabytego w przebiegu przetoczeń. Uszkodzenie komórek wątroby w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby C może ułatwić gromadzenie żelaza w komórkach śródmiąższowych wątroby. Trudno jest określić względny udział zapalenia wątroby i związanego z nim magazynowania żelaza w nieprawidłowym wyniku badania biopsyjnego wątroby i innych wykonywanych testach wątrobowych, ponieważ badania serologiczne na obecność wirusowego zapalenia wątroby typu C były niedostępne w okresie przed włączeniem do leczenia rHuEPO, kiedy to przetoczenia miały powszechne zastosowanie w leczeniu niedokrwistości u chorych z PNN (50).

Niedobór żelaza (bezwzględny lub czynnościowy) jest najczęstszą przyczyną oporności na rHuEPO. Bezwzględny niedobór żelaza jest najczęściej spowodowany utratami krwi, lub niedostateczną jego suplementacją u chorych leczonych erytropoetyną.

Oporność na leczenie erytropoetyną może się niekiedy rozwinąć u pacjentów hemodializowanych z prawidłowym, a nawet ze zwiększonym zapasem żelaza. Stan ten dotyczy czynnościowego niedoboru żelaza i jest spowodowany defektem jego mobilizacji z magazynów ustrojowych (z hemosyderyny i/lub ferrytyny makrofagów) podczas przyśpieszonej regeneracji hemoglobiny. Przyczyną jest najczęściej stan zapalny lub choroba nowotworowa, które powodują zachwianie równowagi między podażą żelaza i istniejącymi jego zapasami ogólnoustrojowymi a możliwościami wykorzystania (54, 92, 104, 180).

Do uznanych współcześnie wskaźników niedoboru żelaza należą miedzy innymi: 1) stężenie żelaza w surowicy poniżej 12 µmol/l; 2) stężenie ferrytyny w osoczu poniżej 100 ng/l (u chorych bez cech aktywnego stanu zapalnego); 3) wysycenie transferyny mniejsze niż 20 % (u chorych z prawidłowym stężeniem tego białka); 4) zwiększenie liczby erytrocytów hipochromicznych (ponad 10 %) oraz zmniejszenie objętości erytrocytów (MCV) i stężenia Hb w retikulocytach (stanowiące czynnik pozwalający na bezpośredni wgląd w stopień zaopatrzenia szpiku kostnego w żelazo i jego wykorzystanie w postaci wbudowania do hemoglobiny); 5) zwiększenie stężenia rozpuszczalnego receptora dla transferyny (sTfR) ponad 10 mg/l (wskaźnik stopnia adekwatności podaży żelaza do komórek prekursorowych erytocyta mający mniejsze znaczenie u pacjentów przyjmujących rHuEPO, ponieważ pobudzenie erytropoezy powoduje zwiększenie poziomu sTfR); 6) wzrost stężenia wolnych protoporfiryn i protoporfiryn związanych cynkiem (stanowiących patologiczne produkty końcowe syntezy hemu, gromadzące się podczas ograniczonej dostępności żelaza w szpiku kostnym) w erytrocytach oraz 7) spadek stężenia ferrytyny w erytrocytach i spadek zawartości żelaza w szpiku kostnym (92, 140, 162).

Czynnościowy niedobór żelaza charakteryzuje się: 1) prawidłowymi lub zwiększonymi zapasami ustroju; 2) prawidłową (> 100 ng/l) lub podwyższoną (> 800 ng/l) ferrytynemią; 3) zmniejszonym (< 20%) lub zmiennym wysyceniem transferyny żelazem; 4) zwiększonym odsetkiem erytrocytów hipochromicznych (ponad 10%); 5) zmniejszoną liczbą retikulocytów (< 15 ‰) oraz 6) zmniejszoną objętością erytrocytów i obniżonym stężeniem Hb w retikulocytach (92).

W zaleceniach European Renal Association, European Dialysis and Transplantation Association (ERA-EDTA) oraz National Kidney Foundation Dialysis Outcomes Quality

Initiative (NKF DOQI) przewiduje się, że jeśli wymienione w tabeli III wskaźniki ulegną obniżeniu, to należy pacjentom podać dożylnie 1000 mg żelaza w okresie 6 – 10 tygodni .

Tabela III. Optymalne wskaźniki świadczące o wyrównaniu gospodarki żelazem (wg ABPG, NKF DOQI i EBPG, ERA-EDTA (178).

Wskaźnik	Optimum	Dopuszczalny zakres
Stężenie ferrytyny w surowicy (μg/l)	≥ 100	200 – 500
Wysycenie transferyny żelazem (TSAT) (%)	> 20	30 – 40
Procent krwinek hipochromicznych (%)	< 10	< 2,5 - < 10

Niedokrwistość definiuje się jako stan ze stężeniem krążącej hemoglobiny wynoszącym mniej niż 12 g/dl u kobiet i 14 g/dl u mężczyzn lub hematokryt wynoszący mniej niż 37 % u kobiet i 40 % u mężczyzn (50). Niedokrwistość obecna jest u większości pacjentów z PNN i jest spowodowana hipoproliferacją szpiku kostnego (najczęściej zaliczana do typu normochromicznego i normocytarnego). Niedokrwistość w chorobach nerek pojawia się zazwyczaj dopiero, gdy wielkość filtracji kłębuszkowej (GFR) zmniejsza się poniżej 20 – 30 ml/min (171, 181). Patogeneza niedokrwistości w chorobach nerek jest złożona i można wyróżnić tu trzy grupy czynników prowadzących do jej powstania u tych chorych (tab. IV). Główną przyczyną jest brak dostatecznych ilości endogennej erytropoetyny. Wraz z pojawieniem się możliwości terapii rekombinowaną erytropoetyną stało się jasne, że, aby osiągnąć cel, pacjent wymaga adekwatnego postępowania w postaci przywrócenia właściwego stężenia żelaza jak i podaży rHuEPO (30, 55, 104, 130). Niedobór żelaza, zarówno całkowity jak i czynnościowy, występuje u większości pacjentów hemodializowanych otrzymujących rHuEPO z uwagi na zwiększone zapotrzebowanie na żelazo spowodowane nasileniem erytropoezy pojawiające się wskutek działania podaży zewnątrzpochodnej rHuEPO, powiązanej z utratą krwi poprzez dializator i linie dializacyjne w czasie odłączania pacjenta od dializy (123). Aby terapia niedokrwistości była skuteczna, należy rozważyć również wpływ innych czynników, warunkujących jej powodzenie.

Tabela IV. Patogeneza niedokrwistości u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek (wg. 66, 135, 181).

1. Skrócenie czasu przeżycia erytrocytów • czynniki zewnatrzkrwinkowe (toksyny mocznicowe) • czynniki wewnątrzkrwinkowe (zmniejszona oporność krwinek czerwonych) • zmniejszona zdolność erytrocytów do przejściowych zmian kształtu • hipersplenizm
2. Utrata krwi • w czasie zabiegów hemodializy • częste pobieranie krwi do badań laboratoryjnych • utajona utrata krwi z przewodu pokarmowego
3. Zahamowanie erytropoezy • niedostateczne wytwarzanie erytropoetyny • niedobór żelaza • niedobór kwasu foliowego • zaawansowana wtórna nadczynność przytarczyc (osteitis fibrosa cystica) • niedostateczna dawka dializy i związane z nią niedodializowanie • współistniejące stany zapalne • wybiórcza aplazja układu czerwonokrwinkowego (PRCA - *Pure Red Cell Anemia*)
4. Hemodylucja

2.6.4. Erytropoetyna, żelazo/nadmiar żelaza i witamina C

Rekombinowaną ludzką erytropoetynę wprowadzono do praktyki klinicznej przed blisko 20 laty. Od tego czasu znalazła ona zastosowanie nie tylko w nefrologii, ale i także w innych specjalnościach jak onkologia, hematologia, reumatologia, neonatologia i chirurgia (49, 138). Model regulacji syntezy erytropoetyny w nerce zakłada, że niedotlenienie nerki spowodowane niedokrwieniem, niedokrwistością czy niską prężnością tlenu atmosferycznego nasila rozpad wewnątrzkomórkowego ATP i powoduje pojawienie się adenozyny, stymulując wewnątrznerkową produkcję prostaglandyn oraz katecholamin. Substancje te łączą się z produkującymi erytropoetynę okołokanalikowymi fibroblastami kory

i zewnętrznej części rdzenia nerki za pomocą specyficznymi receptorów błonowych. Powoduje to aktywację pobudzającego białka G, wzrost aktywności cyklazy adenylowej i pojawienie się cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP). Nukleotyd ten aktywuje kinazę białkową A, która z kolei fosforyluje białka jądra komórkowego inicjujące transkrypcję i translacje mRNA kodującego erytropoetynę, co w efekcie prowadzi do nasilenia jego syntezy i sekrecji. U ludzi istotną klinicznie produkcję stwierdzono ponadto w wątrobie i tkance mózgowej (13, 157). Zmniejszenie syntezy erytropoetyny towarzyszy farmakologicznemu zablokowaniu: receptorów adenozynowych A1, receptorów β_2 układu adrenergicznego, aktywności układu renina-angiotensyna i blokadzie receptorów AT_1 dla angiotensyny II przez teofilinę oraz cyklooksygenazy i tym samym – syntezy naczynioskurczowych prostanoidów oraz resorpcji sodu przez kanalik proksymalny nefronu oraz blokadzie obwodowych receptorów 5-HT_{2A} dla serotoniny przez ketanserynę (13).

Powyższe efekty antyerytropoetynowe wynikają głównie z poprawy ukrwienia i utlenowania nerek i/lub wątroby. U pacjentów z chorobami nerek należy pamiętać o możliwości wystąpienia efektów ubocznych po niektórych lekach, które mogą wywoływać lub nasilać istniejącą niedokrwistość (13).

Ocena gospodarki żelazem u chorych hemodializowanych poddawanych leczeniu rHuEPO ma bardzo istotne znaczenie. Podczas terapii rHuEPO wzrasta zapotrzebowanie na żelazo. Niedobór żelaza jest najczęstszą przyczyną słabej odpowiedzi na stosowaną erytropoetynę (40, 49, 52, 101, 104, 105, 130, 143, 161, 163, 180). U chorych z przewlekłą niewydolnością nerek uzupełnienie niedoboru może poprawić lub nawet spowodować ustąpienie niedokrwistości. Zapasy żelaza magazynowanego w wątrobie, śledzionie i komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego szpiku kostnego wynoszą u chorych z PNN około 1000 mg (jak przestawiono w tabeli XXXIV w Aneksie). U pacjenta leczonego powtarzanymi dializami taki zapas wystarczy na trzy miesiące od momentu rozpoczęcia terapii rHuEPO, przy założeniu zwiększenia wartości hematokrytowej z 25% do 35% (co wiąże się ze zużyciem 600 mg żelaza na wytworzenie erytrocytów). Gdy nie ma suplementacji żelaza podczas leczenia rHuEPO, dochodzi do niedoboru tego pierwiastka (52, 103, 104, 105, 137, 143, 180).

Korekcja niedokrwistości jest niezbędna dla przeżycia i dobrego samopoczucia pacjentów hemodializowanych (49, 101). Terapia erytropoetyną może poprawić parametry morfologii krwi obwodowej bez uciekania się do przetoczeń, które związane są z ryzykiem przeładowania żelazem i nadal – z ryzykiem zakażenia wirusowym zapaleniem wątroby (163). Należy pamiętać, że u pacjentów hemodializowanych dochodzi do przewlekłej utarty

krwi związanej z procedurą hemodializy, częstym pobieraniem krwi, krwawieniami z przewodu pokarmowego oraz moczowo-płciowego spowodowanego heparynizacją (49, 101, 163). Rekombinowana ludzka erytropoetyna stała się skutecznym lekiem w leczeniu niedokrwistości u tych chorych. Niedobór żelaza, stan zapalny, złe odżywianie, nadczynność przytarczyc, zatrucie glinem i niedobór witamin są głównymi czynnikami powodującymi rozwój niedokrwistości i niedostateczną odpowiedź na rHuEPO (32, 38, 86, 92, 155, 180). Infekcje i stany zapalne (często klinicznie trudne do zlokalizowania) mogą być przyczyną zmniejszonej odpowiedzi erytropoezy na podawanie rHuEPO. Wskaźnikami aktywności jawnych lub bliżej nieumiejscowionych stanów zapalnych są wyższe stężenia białka C-reaktywnego, fibrynogenu, TNF-α, IL-1, IL-6 i IFN-δ oraz prokalcytoniny (prawidłowe stężenie 0,1 - 0,5 ng/ml) w surowicy krwi (92). Przyczyny oporności na erytropoetynę przedstawiono w tabeli XXXV w Aneksie pracy.

Odkąd skuteczność terapii rHuEPO zależna jest od dostatecznej dostępności żelaza, często wymagana jest dodatkowa jego podaż. U pacjentów hemodializowanych obserwuje się zmniejszoną absorpcję żelaza z przyjmowanych pokarmów i płynów (49, 52, 101, 104, 163). Innym problemem jest niechęć dializowanych do przyjmowania doustnych preparatów żelaza. Sugeruje się, że preparaty żelaza podawane dożylnie są o wiele bardziej efektywne niż żelazo podawane doustnie (52, 86, 104, 163). W oddziałach hemodializ zwraca się ostatnio coraz większą uwagę na znaczenie dożylnej podaży żelaza, zarówno profilaktycznie jak i leczniczo (40, 86, 103, 137). Poziom ferrytyny wskazujący na nadmiar żelaza u chorych dializowanych wynosi w warunkach prawidłowych powyżej 1000 ng/ml (40, 86).

Decydując się na leczenie żelazem należy rozważyć wszystkie niepożądane skutki przewlekłej podaży żelaza u chorych dializowanych. Należą do nich możliwe powikłania, takie jak (17, 52, 104, 147, 153, 172):

- zajęcie komórek śródmiąższowych, z uszkodzeniem narządów lub bez;
- trwałe uszkodzenie narządów (marskość i/lub zwłóknienie trzustki, rak lub zawał serca);
- zwiększone ryzyko infekcji bakteryjnych (uszkodzenie neutrofili);
- zwiększone tworzenie wolnych rodników z wolnego żelaza powodujące uszkodzenie tkanek przez czynniki utleniające;
- reakcje anafilaktyczne.

Z uwagi na nosicielstwo wirusa HCV przez pacjentów hemodializowanych, dożylna podaż żelaza może nasilać chorobę wątroby u pacjentów z przewlekłym zakażeniem.

Ocena stanu gospodarki żelazem hemodializowanych odgrywa istotną rolę w wykluczeniu czynnościowego niedoboru żelaza (102, 103, 106, 161, 180). Stwierdzenie

niskiego stężenia żelaza w surowicy jest niewystarczające dla oceny jego gospodarki u chorych z PNN. Poziom saturacji transferyny u tych chorych jest z reguły niski (< 20 %). Odpowiedź na zwiększone dawki rHuEPO jest zwykle niewystarczająca. Dożylna podaż żelaza może powodować poprawę odpowiedzi (40, 86).

Ocena zasobów żelaza u hemodializowanych chorych powinna być dokonywana na podstawie oceny wyników:

- stężenia żelaza w surowicy (norma 12 – 27 μmol/l);
- całkowitej zdolności wiązania żelaza (TIBC – *total iron-binding capacity* – norma: 45 – 75 μmol/l) odzwierciedlającej stężenie krążącej transferyny; wartość TIBC wynosząca 50% oznacza, że połowa miejsc wiążących jest wysycona żelazem;
- poziomu wysycenia transferyny (TSAT), równego procentowemu stosunkowi stężenia żelaza do TIBC. Jest on miarą ilości żelaza bezpośrednio dostępnego dla erytropoezy (38, 39, 180).
- stężenia ferrytyny w surowicy (norma w surowicy w stanie fizjologicznym 15 – 300 ng/ml, informującego o ilości zapasów żelaza w ustroju. Trzeba pamiętać ze ferrytyna jest białkiem ostrej fazy i jej stężenie rośnie w stanach zapalnych, dlatego nie jest ona całkowicie swoistym wskaźnikiem gospodarki żelazem. U około 30 – 50% chorych ze schyłkową niewydolnością nerek (zarówno dializowanych, jak i leczonych zachowawczo) stwierdza się podwyższone stężenie CRP (> 8 – 10 mg/l), co jest przejawem aktywnej reakcji zapalnej. Sugeruje się, że hiperferrytynemia dla pacjentów hemodializowanych wynosi powyżej 1000 μg/l.
- liczby odsetkowej hipochromicznych erytrocytów (% hipo), określanej za pomocą autoanalizatorów Technikon. W warunkach fizjologicznych liczba hipochromicznych erytrocytów, w których stężenie hemoglobiny jest niższe niż 28 g/dl, nie przekracza 2,5 %. Zdaniem wielu badaczy zwiększenie odsetka hipochromicznych erytrocytów jest najlepszym wskaźnikiem czynnościowego niedoboru żelaza.

Nasilenie erytropoezy po włączeniu leczenia erytropoetyną może spowodować zmniejszenie wysycenia transferyny (< 20%), mimo prawidłowych zasobów Fe (prawidłowe lub nawet podwyższone stężenia ferrytyny). Taka konfiguracja wartości tych parametrów może być odzwierciedleniem czynnościowego niedoboru Fe lub efektem obecności stanu zapalnego. W obu sytuacjach TSAT może być niższe niż 20%, a stężenie ferrytyny znacznie podwyższone. W wypadku czynnościowego niedoboru Fe leczenie za pomocą rHuEPO powoduje stopniowe obniżanie się stężenia ferrytyny, a w wypadku stanu zapalnego spadkowi TSAT towarzyszy nagły wzrost jej stężenia. Potwierdzeniem stanu zapalnego może być brak reakcji

erytropoetycznej na cotygodniowe infuzje dożylne 50 – 100 mg Fe; w takiej sytuacji należy zaniechać podawania żelaza aż do ustąpienia stanu zapalnego. Na niedobór żelaza wskazuje współistnienie obniżenia stężenia ferrytyny < 100 ng/ml; obniżenie TSAT < 20 % i wystąpienie zwiększonego odsetka erytrocytów hipochromicznych – % hipo > 10% (38, 180).

W licznych badaniach Barclay i wsp. (6), Der-Cherng i wsp. (36, 39), Jensen i wsp. (77), Keven i wsp. (86), Kletzmayr i wsp. (89), Rutkowski i wsp. (136), De Schoenmakere i wsp. (32), Taylor i wsp. (160), Weiss i wsp. (170), Chen i wsp. (21) poszukiwano skutecznych sposobów wspomagania leczenia rHuEPO (przykładowo: wyrównanie niedoborów żelaza z doustnym czy dożylnym żelazem, suplementacja witaminy C oraz karnityny i.v., droga podawania erytropoetyny), by spowodować poprawę wartości hemoglobiny i obniżyć dawki rHuEPO, co spowodowałoby znaczące obniżenie kosztów tej terapii. Uzupełnienie żelaza wydaje się najefektywniejszą z terapii wspomagających leczenie rHuEPO, pozwalając na radykalne zmniejszenie dawek erytropoetyny.

Nadmiar żelaza nie tylko zwiększa śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych i infekcyjnych, lecz także może powodować względną oporność na rHuEPO u pacjentów hemodializowanych (21, 39, 40, 86). Mechanizm hiporeaktywności pozostaje niejasny, lecz nieadekwatna mobilizacja i wadliwa utylizacja żelaza należą do najbardziej prawdopodobnych jej przyczyn (40).

Kwas askorbinowy, jako czynnik redukujący, jest zdolny do uwalniania żelaza z ferrytyny i mobilizacji żelaza z układu siateczkowo-sródbłonkowego do transferyny (28, 40, 58, 82). Prowadzi to do zwiększenia dostępności żelaza. Goldberg (61) wskazał, że kwas askorbinowy utrzymuje hemoglobinowe żelazo w stanie zredukowanym i nasila enzymatyczne wbudowanie żelaza do protoporfiryn (40). Wpływ kwasu askorbinowego na poprawę odpowiedzi na rHuEPO tłumaczy zwiększona mobilizacja żelaza w komórkach prekursorowych erytrocyta (21, 36, 40, 86). Niedobór wodorozpuszczalnej witaminy C opisywano wcześniej u pacjentów hemodializowanych. Jej suplementacja, z uwagi na wspomniany niedobór, jest istotna. Zalecana dawka witaminy C wg danych piśmiennictwa pochodzących z różnych ośrodków dializacyjnych waha się między 55 a 1000 mg/dobę (21, 39, 41, 62, 72, 86, 168). Nadmierna podaż witaminy C może pogorszyć mocznicozależną oksalozę (39, 62, 87, 133, 145, 165), stąd też suplementacja nie przekraczająca 150 mg/dobę uważana jest za dawkę bezpieczną (39). W ostatnio przeprowadzonych badaniach obserwowano u pacjentów hemodializowanych pozytywne wyniki leczenia dożylną witaminą C, jako wspomaganie terapii rekombinowaną erytropoetyną, prowadząc równoczesną oceną stanu gospodarki żelazem (21, 36, 39, 41, 86, 103, 146, 155, 163, 168).

Wydaje się, że problem ten nie był do końca rozstrzygnięty, z różnych przyczyn. Jedną z nich był brak badań nad wzajemnymi zależnościami pomiędzy podażą witaminy C, leczeniem żelazem i leczeniem erytropoetyną. Nie analizowano dokładnie roli, jaką może odgrywać witamina C w optymalizacji odpowiedzi hemodializowanych na rHuEPO i żelazo.

Wyjaśnienie tych związków i zależności legły u podstaw koncepcji mniejszej pracy.

3. CELE PRACY

Niniejsza praca miała na celu:

1. Ocenę stężenia witaminy C w grupie chorych hemodializowanych w porównaniu do grupy referencyjnej osób zdrowych.
2. Ocenę wpływu zabiegu hemodializy na stężenia witaminy C.
3. Ocenę wpływu sezonowości na zmiany stężenia witaminy C u chorych dializowanych oraz grupy referencyjnej osób zdrowych.
4. Dokonanie próby oceny współzależności pomiędzy odpowiedzią na leczenie rHuEPO a stężeniem witaminy C.
5. Ocenę wpływu suplementacji witaminy C u pacjentów z jej niedoborem na hemopoezę.

4. MATERIAŁ I METODYKA

4.1. Materiał kliniczny

Program badawczy, na który uzyskano zgodę Komisji Biotycznej przy Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie, został zaplanowany dwuetapowo.

W pierwszym etapie projekt miał na celu określenie stężenia witaminy C występującego w populacji chorych przewlekle hemodializowanych w Klinice Nefrologii i porównanie go w stosunku do grupy referencyjnej osób zdrowych oraz ocenę wpływu zabiegu hemodializy na zmianę jej stężenia. Ponieważ głównym źródłem witaminy C są owoce i jarzyny, a ich spożycie w Polsce podlega okresowym zmianom związanym z porami roku i klimatem, dokonano oceny zakresu zmian stężeń oraz spożycia witaminy C (na podstawie okresowo przeprowadzanych wywiadów dietetycznych) w omawianej grupie pacjentów w zależności od pory roku i zabiegu hemodializy.

Do badania w etapie I zakwalifikowano 112 chorych (73 mężczyzn i 39 kobiet) z przewlekłą niewydolnością nerek, którzy byli leczeni powtarzanymi hemodializami przez okres ponad 12 miesięcy, w cyklu trzy zabiegi HD w tygodniu (czas trwania dializy – cztery do pięciu godzin) w Klinice Nefrologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie oraz 23 zdrowych ochotników (7 mężczyzn i 16 kobiet) wydolnych nerkowo (tabela V).

W badanej grupie 1 osoba była wcześniej poddana przeszczepieniu nerki, a 4 osoby były (przed rozpoczęciem leczenia hemodializami) dializowane otrzewnowo. Wszyscy pacjenci po zapoznaniu się z informacjami o przebiegu badania podpisali świadomą zgodę na udział. W trakcie rocznej obserwacji 26 pacjentów zostało przeniesionych do innego ośrodka leczenia dializami (z powodu odległości od Kliniki Nefrologii oznaczenie witaminy C u tych chorych było niemożliwe z braku gwarancji poprawności prawidłowego przeprowadzenia procedury laboratoryjnej jej oznaczenia), 9 chorych zmarło, u 5 chorych wykonano zabieg przeszczepienia nerki, 2 osoby wycofały zgodę na dalszy udział w badaniu, 1 chory został wyłączony z powodu niestabilnego stanu klinicznego.

Pierwsza grupa pacjentów była obserwowana przez okres jednego roku. W tym okresie krew pobierano w chwili włączenia do badania, a następnie po 4, 8, i 12 miesiącach (wg schematu: na początku hemodializy oraz po trzech godzinach zabiegu). Schemat obowiązywał przez wszystkie cztery pory roku. Równocześnie z oceną stężenia witaminy C oceniano gospodarkę żelazem, jej wpływ na hemopoezę oraz czynniki mogące wpływać na oporność na ludzką rekombinowaną erytropoetynę, do których zaliczono:

- niedobór witaminy B_{12} i/lub kwasu foliowego,
- zatrucie glinem,
- nadczynność przytarczyc.

W trakcie prowadzonego badania kontrolowano stężenia:

- mocznika (przed/po hemodializie),
- kreatyniny (przed/po hemodializie),
- białka całkowitego,
- albuminy,
- wapnia całkowitego ,
- wapnia zjonizowanego,
- fosforanów,
- żelaza,
- ferrytyny

oraz oceniano stopień wysycenia transferyny żelazem.

Skuteczność dializy oceniono wyliczając wartość wskaźnika dializy Kt/V i stosunek frakcji Ct/Co dla kreatyniny.

W II etapie, w drugim roku badań, prowadzono je w grupie 68 chorych. Do badań zakwalifikowano 26 kobiet oraz 42 mężczyzn, u których nie stwierdzono klinicznych cech aktywnego procesu zapalnego. Rozpoczęto suplementację witaminą C 3 x w tygodniu w dawce 200 mg dożylnie, przez 8 tygodni (zgodnie z danymi z piśmiennictwa, dawka taka u chorych hemodializowanych jest bezpieczna). Badano stężenia witaminy C bezpośrednio przed rozpoczęciem cyklu podaży, tydzień po zakończeniu 8 tygodniowego okresu suplementacji, po 8 tygodniach przerwy w cyklu suplementacji. Po 6 miesiącach od rozpoczęcie drugiej fazy badania ponownie oceniono gospodarkę żelazem oraz hemopoezę wraz ze zużyciem rHuEPO. Równocześnie określono parametry, które mogły wywołać oporność na podawaną erytropoetynę. W drugim roku, z uwagi na istotny udział witaminy C w erytropoezie, analizie poddano zależność zachodzącą pomiędzy jej stężeniem a skutecznością leczenia niedokrwistości nerkowopochodnej erytropoetyną podawaną parenteralnie oraz wpływ, jaki wywierała suplementacja witaminy C na wartości parametrów morfologii krwi obwodowej oraz gospodarkę żelazem. W przypadku zaobserwowania skutków ubocznych, natychmiast odstawiano witaminę C.

Charakterystykę badanych grup w I i II etapie oraz grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli V. Przyczyny niewydolności nerek w badanych grup w obu etapach przedstawiono w tabeli VI.

Tabela V. Charakterystyka grupy badanej.

Badani	**I etap**	**II etap**	**Grupa kontrolna**
Pacjenci	112	68	23
Wiek (lata)	21 – 79 (śr. 52,9)	26 – 79 (śr. 53,9)	23 – 55 (śr. 35,4)
Płeć: K/M (%)	39/73 (34,8 %/65,2 %)	26/42 (38,2 %/61,8 %)	16/7 (69,6 %/30,4 %)
Palenie tytoniu: K/M (%)	3/24 (7,7 %/32,9 %)	3/13 (11,1 %/30,6 %)	2/2 (12,5 %/28,6 %)

Tabela VI. Przyczyny niewydolności nerek w badanej grupie chorych.

Przyczyny niewydolności nerek	**I etap**	**II etap**

1. Marskość nerek o nieustalonej przyczynie	42 (37,5 %)	26 (37,7 %)
2. Przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek	29 (25,7 %)	17 (24,6 %)
3. Zwyrodnienie wielotorbielowate nerek	13 (11,6 %)	11 (15,9 %)
4. Przewlekłe odmiedniczkowe zapalenie nerek	7 (6,3 %)	5 (9,0 %)
5. Kamica nerkowa	6 (5,4 %)	4 (5,8 %)
6. Nefropatia cukrzycowa,	6 (5,4 %)	1 (1,4 %)
7. Nephrosclerosis	3 (2,7 %)	1 (1,4 %)
8. Nefropatia dnawa	1 (0,9 %)	1 (1,4 %)
9. Obustronna nefrektomia z powodu ropni	1 (0,9 %)	1 (1,4 %)
10. Toczeń trzewny	1 (0,9 %)	0
11. Gwałtownie postępujące kłębuszkowe zapalenie nerek	1 (0,9 %)	1 (1,4 %)
12. Kwasica cewkowa	1 (0,9 %)	0
13. Amyloidoza	1 (0,9 %)	0

4.1.1. Ocena stanu klinicznego, wywiady dietetyczne.

4.1.1.1. Badanie podmiotowe.

Z każdym chorym i z każdą osobą z grupy kontrolnej przeprowadzono dokładny wywiad dietetyczny oceniający ilość spożywanej witaminy C i potasu przeprowadzono. Ocena została przeprowadzona na podstawie wywiadów żywieniowych w formie kwestionariuszy (tabela VII) obejmujących warzywa (marchew, paprykę czerwoną/zieloną, pomidory, ziemniaki, ogórki), warzywa liściaste (sałatę, kapustę, kalafior, brokuły, brukselkę), owoce cytrusowe (cytryny, pomarańcze, grejpfruty, mandarynki i inne), owoce pestkowe (jabłka, gruszki, brzoskwinie, czereśnie, truskawki, śliwki, jagody, melony), przetwory, soki i zupy owocowe/jarzynowe oraz sałatki) spożyte w ciągu siedmiu kolejnych dni. Dane te analizowano korzystając z „Albumu fotografii produktów i potraw" (158) o zróżnicowanej wielkości porcji. Uzyskane wyniki zakodowano i wprowadzono do bazy danych. Badanie

powyższe wykonano czterokrotnie w ciągu roku w porze wiosennej, letniej, jesiennej i zimowej. Uzyskane w ten sposób ilościowe zapisy żywieniowe opracowano przy pomocy programu komputerowego obliczeń wartości odżywczej dobowych racji pokarmowych (wg. „Tabel wartości odżywczej produktów spożywczych") (94). Program ten został udostępniony przez Zakład Higieny CMUJ w Krakowie.

4.1.1.2 Badanie przedmiotowe

We wszystkich grupach zostało przeprowadzone dokładne badanie fizykalne uczestników, na podstawie którego oceniono aktualny stan zdrowia oraz wykluczono kliniczne cechy aktywnego stanu zapalnego.

Tabela VII. Kwestionariusz oceniający spożycie witaminy C oraz potasu w diecie.

Imię i nazwisko pacjenta
Proszę napisać ile porcji w danym dniu (np. 2 duże jabłka, szklanka czereśni i czy gotowane - np. 3 ziemniaki duże gotowane). Jeśli nie spożywał/a Pan/i owoców i warzyw proszę wpisać: 0

Dni tygodnia	**Owoce cytrusowe (cytryny, pomarańcze, grejpfruty, mandarynki, inne)**	**Inne owoce (jabłka, gruszki, brzoskwinie, czereśnie, truskawki, śliwki, jagody, melony, inne)**	**Warzywa (marchew, papryka czer./zielona, pomidory, ziemniaki, ogórki, inne)**	**Warzywa liściaste (sałata, kapusta, kalafior, brokuły, brukselki, inne)**	**Przetwory, soki i zupy owocowe/ jarzynowe oraz inne sałatki**
Poniedziałek					
Wtorek					
Środa					

Czwartek					
Piątek					
Sobota					
Niedziela					
Poniedziałek					

4.2. Metodyka oznaczania stężeń witaminy C.

4.2.1. Oznaczanie stężeń witaminy C.

W pierwszej fazie badania, krew do oznaczenia stężenia witaminy C pobrano na początku hemodializy oraz po 3 godzinach trwania zabiegu, z linii tętniczej (lub z przetoki tętniczo-żylnej – co odpowiadało krwi napływającej do przetoki tętniczo-żylnej). Pacjenci mieli podawaną zleconą dawkę fraxiparyny na kilka minut przed pobraniem krwi. W trakcie hemodializy brano pod uwagę ultrafiltrację oraz zlecony czas trwania zabiegu. Równocześnie pobierano krew od osób z grupy kontrolnej.

W drugim etapie badania wykonywano taką samą procedurę, z pewnym wyjątkiem, t.j. po zakończeniu suplementacji witaminy C (w dalszych pomiarach) oznaczono jej stężenia tylko przed zabiegiem hemodializy. Stężenie witaminy C badano bezpośrednio przed rozpoczęciem cyklu podaży, tydzień po zakończeniu ośmiotygodniowego cyklu suplementacji oraz ponownie po 8-miu tygodniach od zakończenia cyklu suplementacji.

Pobraną krew wirowano z prędkością 4000 obrotów/min. przez 5 minut w temperaturze 4 °C, w celu oddzielenia osocza od masy krwinkowej. Do wcześniej przygotowanych probówek zawierających mieszaninę odbiałczającą (10 % kwas nadchlorowy – zawierający 1 % kwas meta-fosforowy) dodano uzyskane osocze. Tak przygotowany materiał umieszczono na 60 minut w temperaturze 4 °C w celu wytrącenia białek a następnie wirowano przy 20000 x g przez 10 minut (10). Po odwirowaniu otrzymany supernatant rozcieńczono fazą ruchomą (w stosunku 1 : 1) i nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną w celu oznaczenia stężenia witaminy C.

Stężenie witaminy C oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w oparciu o procedurę opisaną przez Esteve'a i wsp. (51) oraz Rümelina i wsp. (134). Używanymi w tej metodzie odczynnikami były:

- Wzorzec witaminy C firmy *Sigma-AIdrich*, Wielka Brytania

- Kwas meta-fosforowy (MPA) firmy *Merck-Darmstadt,* Niemcy
- Kwaśny fosforan amonu ($NH_4H_2PO_4$) firmy *POCh*, Gliwice, Polska
- Kwas fosforowy (H_3PO_4) firmy *POCh,* Gliwice, Polska
- Metanol – HPLC firmy *Labscan*, Irlandia
- Kwas nadchlorowy (PCA) firmy *Ferak Berlin,* Niemcy
- Woda dejonizowana

Do oznaczania witaminy C zastosowano zestaw HPLC w skład którego wchodziły:

- zbiornik fazy ruchomej,
- pompa firmy *BECKMAN* model 110A,
- kolumna chromatograficzna z odwróconym układem faz (RP - 18) firmy *MERCK - DARMSTADT* o długości 25 cm, średnicy 4,6 mm i średnicy ziaren 5 μm,
- detektor UV *LKB BROMMA 2140 RAP1D SPECTRAL DETECTOR OPTICAL UNIT,*
- dozownik firmy *RHEODYNE,* model 7010.

Wyniki analizy były opracowywane komputerowo za pomocą szwedzkiego programu *WA VESCAN.*

Próbkę do badań przygotowano według wcześniej opisanej procedury (10). Z uzyskanego osocza pobrano 300 μl, które dodano do 300 μl mieszaniny odbiałczającej (10 % PCA z 1 % MPA) silnie mieszając próbkę na wytrząsarce w celu wytrącenia białek. Dla zapewnienia całkowitego i dokładnego odbiałczenia materiału tak przygotowane próbki pozostawiono na 60 minut w temperaturze 4 °C bez dostępu światła (uniknięcie samorzutnego utlenienia kwasu askorbinowego). Następnie próbki wirowano przy 20000 x g przez 10 minut w temperaturze 4 °C. Z otrzymanego supernatantu odbierano pipetą 200 μl i przed samą analizą dodawano do nich 200 μl rozwijającej fazy. Strzykawką pobierano 50 μl przygotowanej mieszaniny i wprowadzano na kolumnę. Z próbkami przechowanymi w stanie zamrożonym - po rozmrożeniu w temperaturze pokojowej - postępowano identycznie. Wszystkie próbki oznaczano w dubletach, wyniki podawano jako średnie oznaczenie z dwóch pomiarów.

Stężenie witaminy C w badanych próbkach odczytywano z krzywej kalibracji, którą sporządzono na podstawie sześciu roztworów wzorcowych kwasu askorbinowego w stężeniach 2,5 μg/ml; 5 μg/ml; 10 μg/ml; 20 μg/ml; 40 μg/ml; 80 μg/ml. Z każdego roztworu wzorcowego pobierano 200 μl i dodawano do 200 μl 10 % PCA zawierającego 1 % MPA (mieszanina odbiałczająca), a następnie umieszczono w temperaturze 4 °C, aby zapobiec rozkładowi witaminy C. Przed samą analizą dodawano jeszcze 400 μl fazy i nastrzyknięto na kolumnę w objętości opisanej powyżej. Następnie mierzono wysokość szczytu absorpcji światła dla każdego wzorcowego roztworu kwasu askorbinowego. Wyniki pomiaru

naniesiono na układ współrzędny, przedstawiający zależność absorpcji światła (y) od stężenia witaminy C (x). Stężenie kwasu askorbinowego w badanych próbkach odczytywano z krzywej kalibracji. Dla zapewnienia dłuższej trwałości kolumny i stabilności linii podstawowej *(ang. baseline),* po każdych trzech analizach, płukano kolumnę metanolem zmieszanym z wodą w stosunku 3:1 przez 10 minut, przy przepływie 1.6 ml/min.

4.2.2. Badania biochemiczne

W celu kontroli ogólnego stanu badanych chorych oraz oceny skuteczności zabiegów hemodializy, w surowicy krwi osób badanych oznaczono następujące parametry będące przedmiotem analizy w niniejszym badaniu:

- stężenie hemoglobiny i hematokrytu (*Cobas Argos 5*; Roche),
- stężenie kwasu foliowego (*Automated chemiluminescence System, ACS:180*; Bayer, N.Y., USA),
- stężenie ferrytyny (*Electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA*; Elecsys System 1010/2010LIA, Roche, Mannheim, Niemcy),
- stężenie witaminy B_{12} (*Electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA*; Elecsys 2010 System Vitamin B_{12} Immunoassay; Roche, Mannheim, Niemcy),
- stężenia: mocznika, kreatyniny, albuminy potasu, wapnia całkowitego, fosforanów (Hitachi 917 Analyzer).

Powyższe badania biochemiczne wykonano metodami standardowymi w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie (Kierownik Zakładu: prof. dr hab. J. Naskalski). Wyniki uzyskane w trakcie badań odnoszono do zakresów zakładowych wartości referencyjnych (patrz tabela XXXVI w Aneksie).

U badanych chorych dodatkowo oznaczono stężenia (patrz tabela XXXVI w Aneksie):

- parathormonu (Intact Human PTH; Bio Source, Belgia)
  (badanie przeprowadzono w Medycznym Centrum Laboratoryjnym DIAGNOSTYKA metodą immunoradiometryczną);
- glinu (S-Monovette, Sarstedt) – do oznaczeń stosowano spektrometr absorpcji atomowej – Perkin Elmer, USA
  (badania te przeprowadzono w Pracowni Biopierwiastków w Zakładzie Bromatologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego) (Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Z. Zachwieja) (7).

4.2.3. Ocena parametrów określających adekwatność dializy

Do oceny skuteczności dializy u pacjentów hemodializowanych wykorzystano oznaczenia Kt/V – wskaźnika dializy opisującego frakcjonowany klirens mocznika w czasie, odnoszony do objętości dystrybucji, tj. całkowitej objętości wody ustroju, obliczony według wzoru: Kt/V = ln C0/C1, gdzie C0 oznacza stężenie mocznika przed dializą, a C1 – stężenie mocznika po dializie. Obecnie uważa się, że dla chorych hemodializowanych 3 razy w tygodniu, wartość wskaźnika Kt/V powinna wynosić od 1,2 do 1,4 w modelu 1-przedziałowym (163).

Wszystkie parametry modelowania kinetycznego w grupie chorych hemodializowanych były wyliczone z wykorzystaniem programu Nephron for Windows 97 w oparciu o wykonane oznaczenia biochemiczne, z wykorzystaniem modelu 1-przedziałowego ze zmienną objętością dystrybucji (*single pool, volume variable, SPVV*).

4.2.4. Analiza statystyczna.

Zebrany materiał zawierający wyniki stężeń poszczególnych związków biochemicznych i dane dotyczące ankiet żywieniowych u chorych z niewydolnością nerek przedstawiono w postaci tabeli i wykresów. Stosując metody statystyki opisowej dla grupy chorych hemodializowanych oraz w obrębie podgrup i grupy kontrolnej obliczano parametry takie jak: średnia arytmetyczna, mediana, odchylenie standardowe, rozstęp *minimum* – *maksimum*.

W toku dalszej analizy (ze względu na brak normalności rozkładu analizowanych parametrów w obrębie badanych grup i podgrup chorych) stosowano metody analizy statystycznej opierające się na testach nieparametrycznych (ANOVA Friedmana, Kołmogorowa-Smirnowa, Manna-Whiney'a i Wilcoxona). Do obliczeń wykorzystano licencjonowany pakiet Statistica 5.5. (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

5. WYNIKI

5.1. Analiza stężeń witaminy C podczas obserwacji jednorocznej.

5.1.1. Stężenia witaminy C w grupie chorych dializowanych i w grupie kontrolnej.

W analizie porównawczej poddano wyniki uzyskane podczas obserwacji jednorocznej u 112 chorych dializowanych (73 mężczyzn – 65,2 %, 39 kobiet – 34,8 %) i 23 ochotników z grupy kontrolnej (7 mężczyzn – 30,4 % i 16 kobiet – 69,6 %).

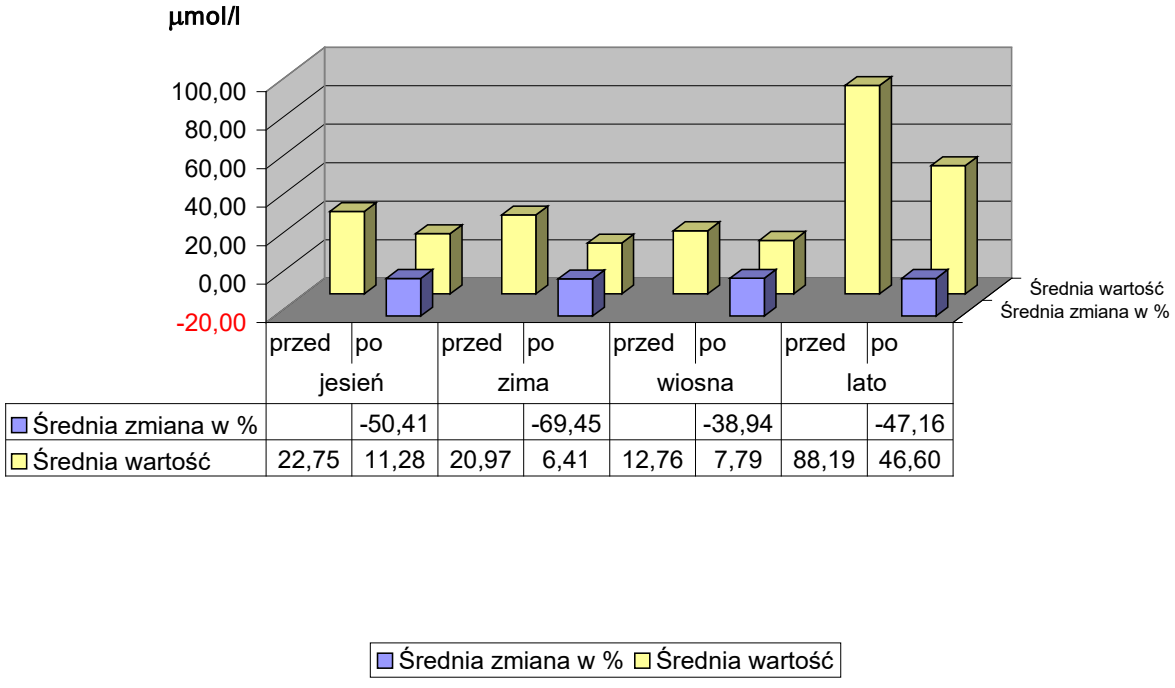
Ze względu na brak rozkładu normalnego ($p<0,05$ w teście Shapiro-Wilka dla większości zmiennych), w analizie statystycznej wykorzystano testy nieparametryczne – a zmienne przedstawiono jako medianę, rozstęp międzykwartylowy i zakres (min-maks.).

W pierwszym roku badania w grupie dializowanych, oznaczono stężenia witaminy C przed i po HD aby ocenić jej średni spadek (wyrażonych w procentach) dla poszczególnych pór roku oraz łączny spadek stężeń tej witaminy po zabiegu HD. Uzyskane wyniki

przedstawiono w tabeli VIII. Średnie stężenia witaminy C oraz procentowe zmiany przed - i po hemodializie w zależności od pory roku przestawiono na ryc. 1.

Tabela VIII. Średni spadek stężenia witaminy C po HD wyrażony w procentach dla poszczególnych pór roku.

	Pora roku	Średni spadek (Δ wit.C) w %
Spadek stężenia witaminy C (Δ wit. C) po HD w %	Jesień	- 50,41
	Zima	- 69,45
	Wiosna	- 38,94
	Lato	- 47,16
	Łącznie	- 45,04



Rycina. 1 Średnie stężenie witaminy C oraz zmiana procentowa przed - i po hemodializie w zależności od pory roku.

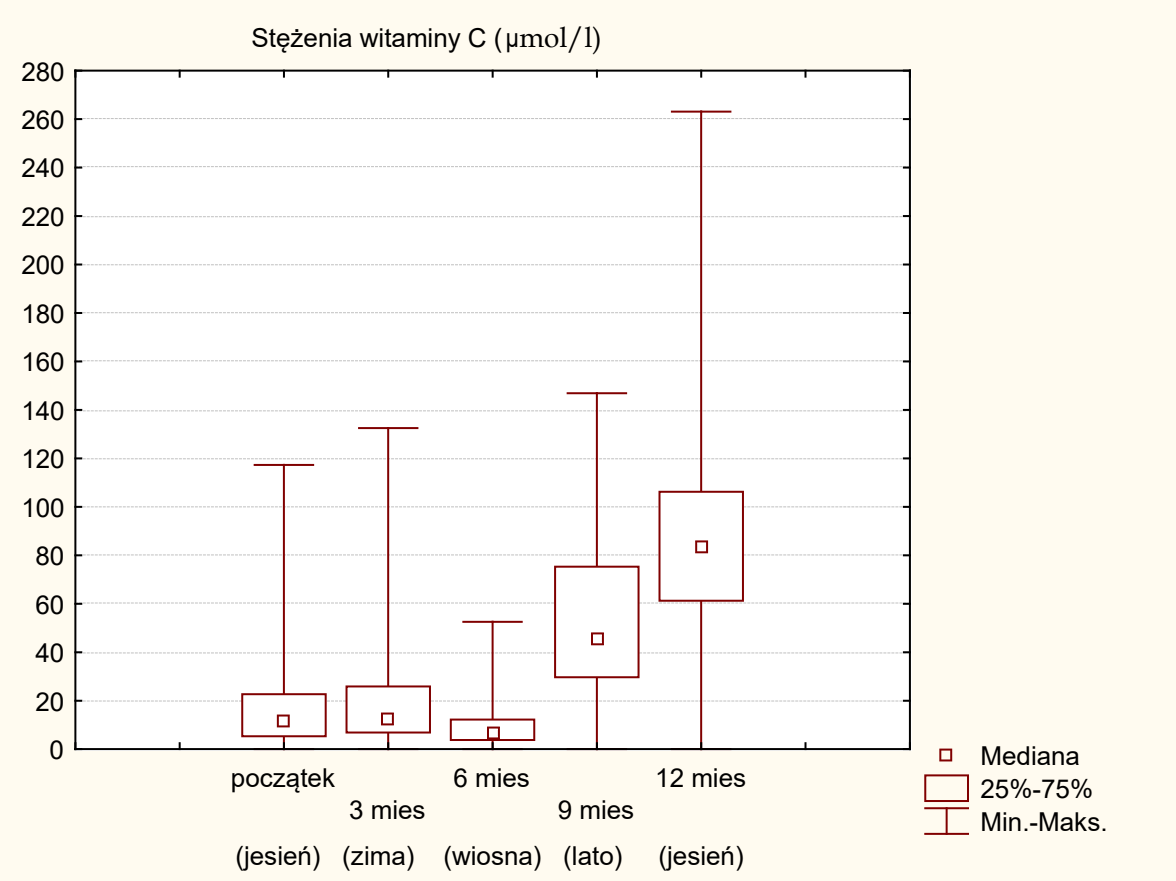
W tabeli IX przedstawiono stężenia witaminy C w kolejnych badaniach w populacji chorych dializowanych w cyklu rocznym (początek obserwacji – jesień; 3 mies. obserwacji – zima; 6 mies. obserwacji – wiosna; 9 mies. obserwacji – lato; 12 mies. obserwacji - jesień). Najwyższe stężenia witaminy C stwierdzono w okresie letnim (45,46 μmol/l), a najniższe stężenia witaminy C - na wiosnę (6,78 μmol/l). Nieoczekiwany wzrost stężenia witaminy C stwierdzono w grupie hemodializowanych 12 miesięcy od rozpoczęcia badania – w jesieni (83,23 μmol/l).

Tabela IX. Stężenia witaminy C w kolejnych badaniach w populacji chorych dializowanych.

Okres badania	**Pory roku**	**Mediana** (μmol/l)	**Minimum*** (μmol/l)	**Maksimum** (μmol/l)	**Rozstęp** (μmol/l)
Początek	jesień	11,79	0,00	117,31	17,39
3 mies.	zima	12,34	0,00	132,49	18,98
6 mies.	wiosna	6,78	0,00	52,52	8,45
9 mies.	lato	45,46	0,00	146,91	45,67
12 mies.	jesień	83,23	0,00	263,11	44,98

* wartość „zero" oznacza stężenia poniżej progu czułości metody

W teście ANOVA Friedmana stwierdzono statystycznie istotne różnice ($p<0,00001$) pomiędzy średnimi wartościami stężenia witaminy C w populacji chorych dializowanych w kolejnych badaniach pomiędzy początkiem badania a 9 i 12 miesiącem (Ryc. 2). Najwyższe stężenia witaminy C stwierdzono w lecie, a najniższe stężenia witaminy C na wiosnę. Nieoczekiwany wzrost wartości średniej stężenia witaminy C stwierdzono ponownie 12 miesięcy od początku badania – w jesieni (początek obserwacji - jesień).



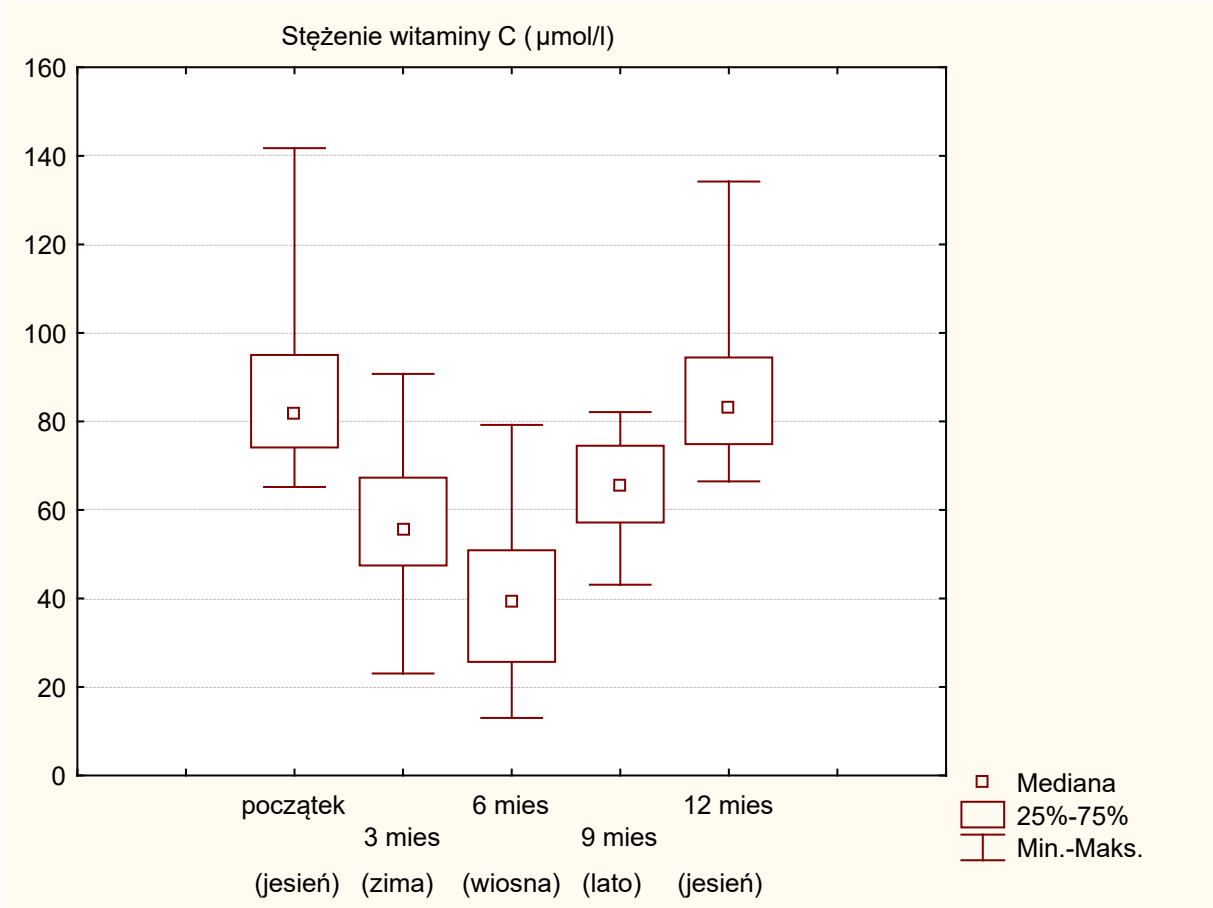
Rycina. 2. Stężenia witaminy C w kolejnych badaniach w populacji chorych dializowanych

W tabeli X przedstawiono stężenia witaminy C w kolejnych badaniach w grupie kontrolnej (początek obserwacji – jesień; 3 mies. obserwacji – zima; 6 mies. obserwacji – wiosna; 9 mies. obserwacji – lato; 12 mies. obserwacji - jesień). Najwyższe średnie stężenia witaminy C

stwierdzono w jesieni (81,91 µmol/l), a najniższe stężenia witaminy C na wiosnę (39,44 µmol/l). Porównywalne stężenia witaminy C stwierdzono 12 miesięcy od początku badania – w jesieni (82,95 µmol/l). W teście ANOVA Friedmana stwierdzono statystycznie istotne różnice ($p<0,00001$) pomiędzy stężeniami witaminy C w grupie kontrolnej w kolejnych badaniach, pomiędzy początkiem badania a miesiącami 3, 6, 9, i 12 (ryc. 3). Najwyższe stężenia witaminy C stwierdzono w jesieni, a najniższe stężenia witaminy C na wiosnę. W badanej grupie stwierdzono porównywalne stężenia witaminy C na początku badania (jesień) i 12 miesięcy po rozpoczęciu badania.

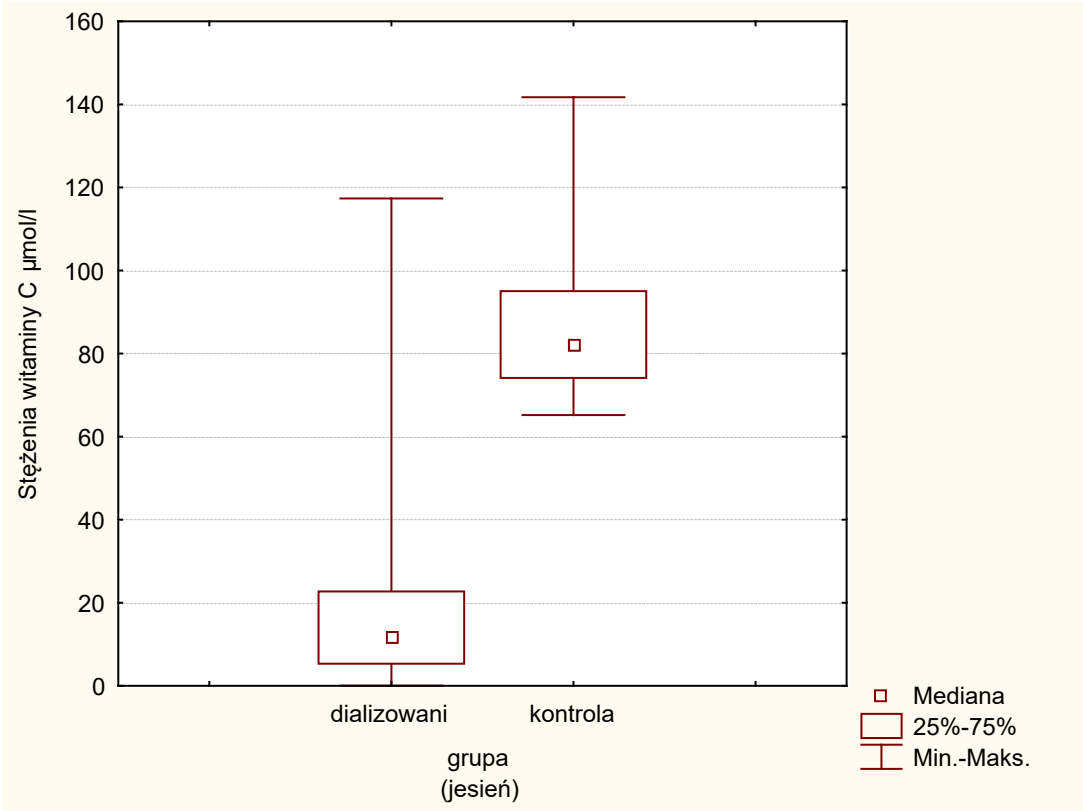
Tabela X. Stężenia witaminy C w trakcie kolejnych badań w grupie kontrolnej.

Okres badania	**Pory roku**	**Mediana** (µmol/l)	**Minimum** (µmol/l)	**Maksimum** (µmol/l)	**Rozstęp** (µmol/l)
Początek	jesień	81,91	65,15	141,70	20,90
3 mies.	zima	55,54	23,03	90,72	19,86
6 mies.	wiosna	39,44	12,98	79,20	25,22
9 mies.	lato	65,69	43,09	82,07	17,34
12 mies.	jesień	82,95	66,43	134,17	19,59

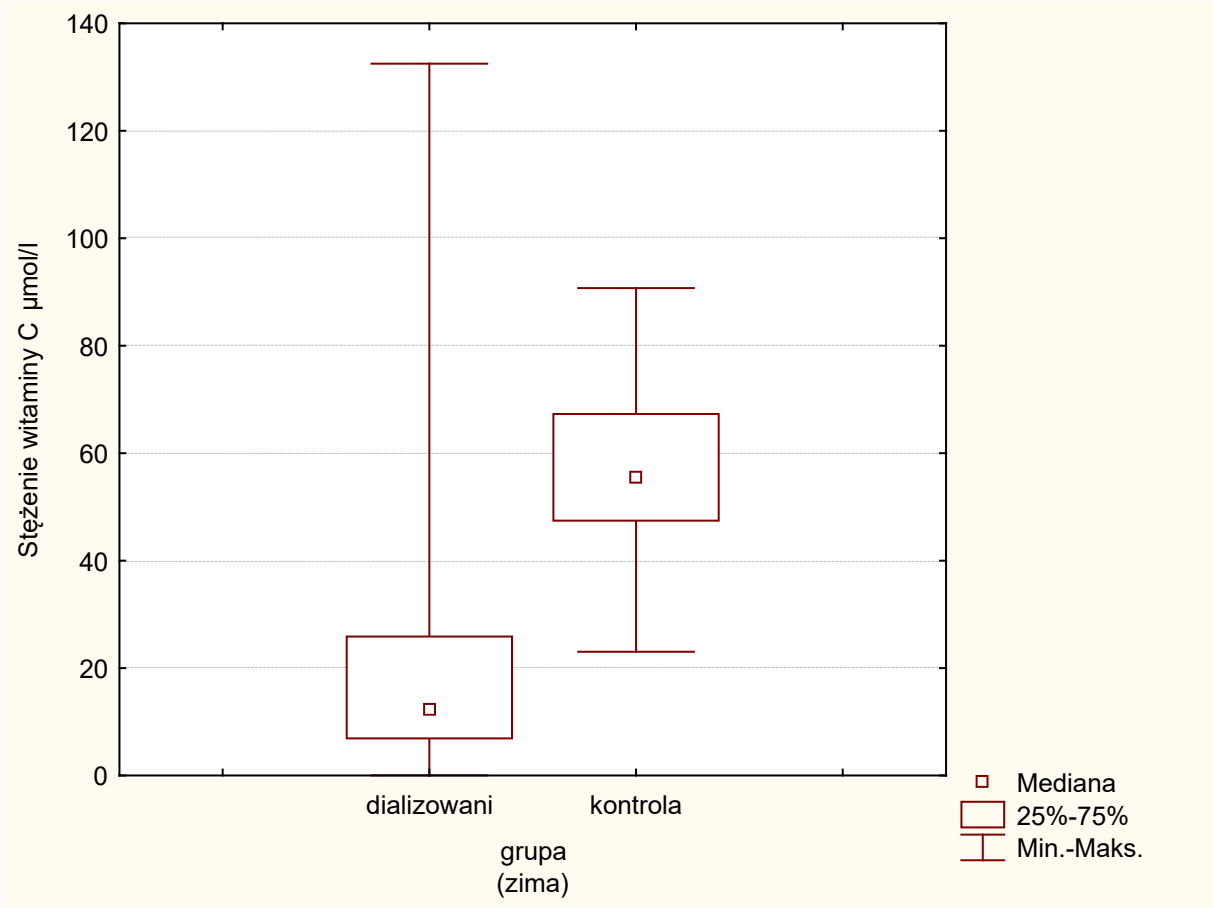


Rycina 3. Stężenia witaminy C w trakcie kolejnych badań w grupie kontrolnej.

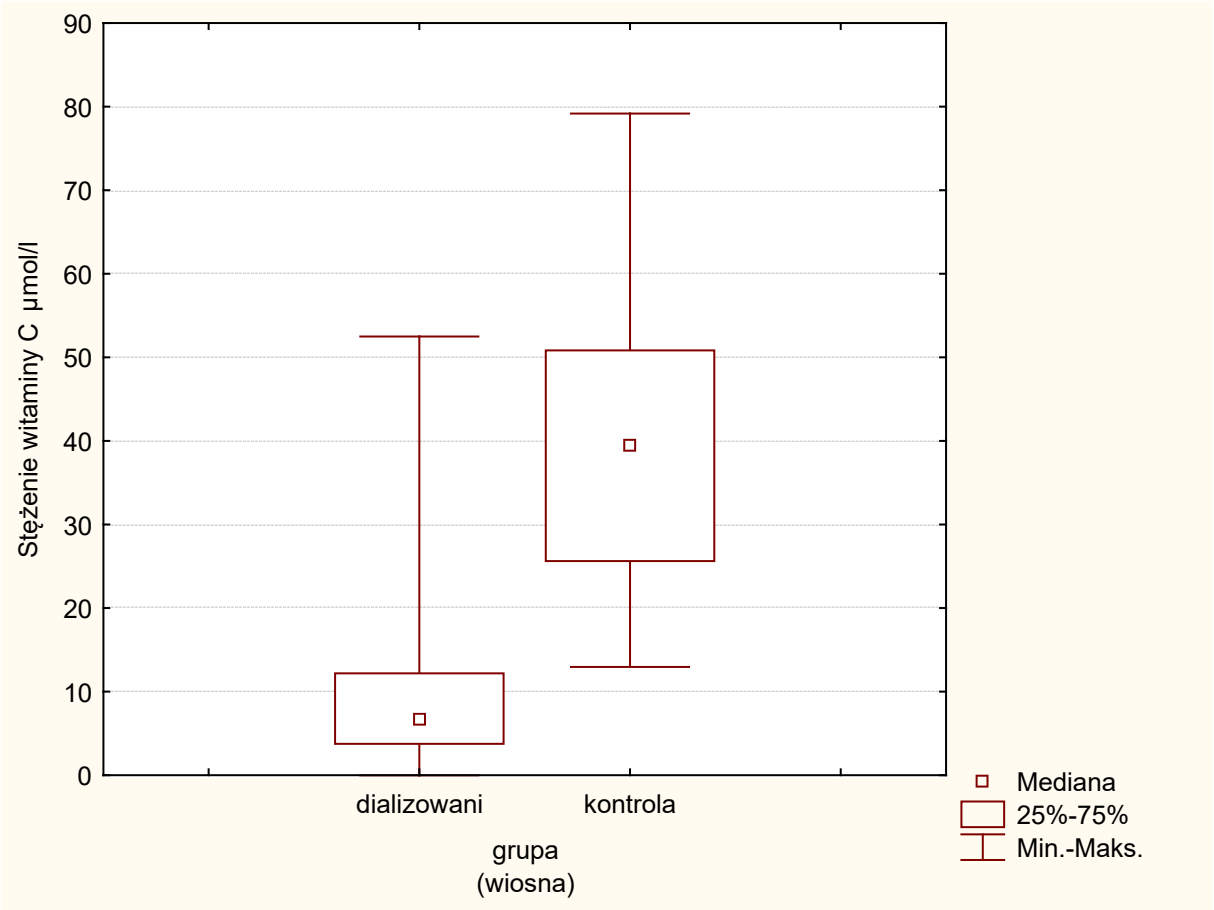
W teście Manna-Whiney'a stwierdzono statystycznie znamienne różnice ($p<0,05$) pomiędzy stężeniami witaminy C u chorych dializowanych i grupą kontrolną na początku obserwacji (jesień) oraz po 3 (zima), 6 (wiosna) i 9 (lato) miesiącach. Średnie stężenia witaminy C w grupie kontrolnej były w analogicznych okresach wyższe, a róznica była statystycznie istotna w porównaniu do grupy dializowanych. Po 12 miesiącach obserwacji (jesień) stężenia witaminy C nie różniły się istotnie między obiema grupami (ryciny 4, 5, 6, 7 i 8).



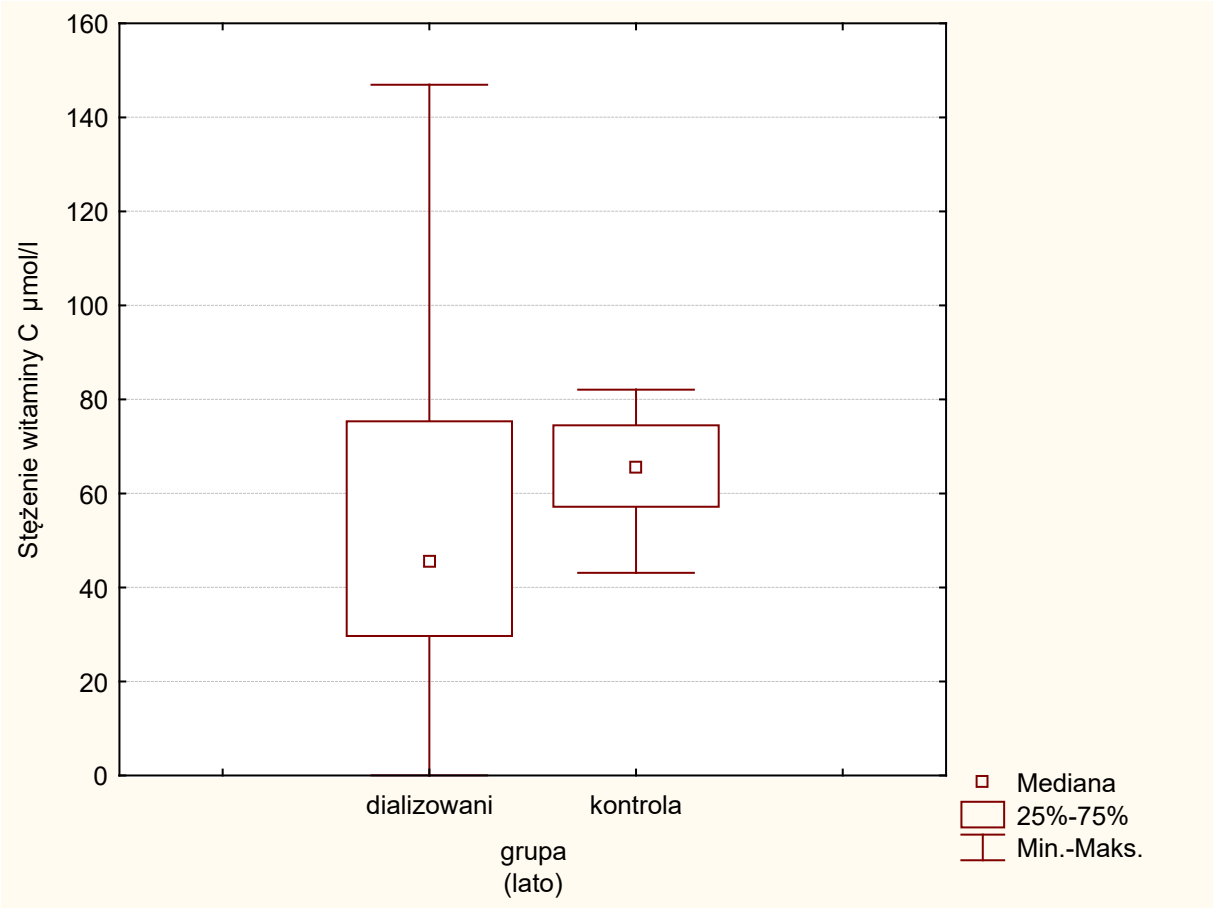
Rycina 4. Różnice w stężeniach witaminy C pomiędzy chorymi dializowanymi i grupą kontrolą na początku badania (jesień; p<0,001; $Me_{dializowani}$= 11,79 µmol/l; $Me_{kontrola}$ = 81,91 µmol/l).



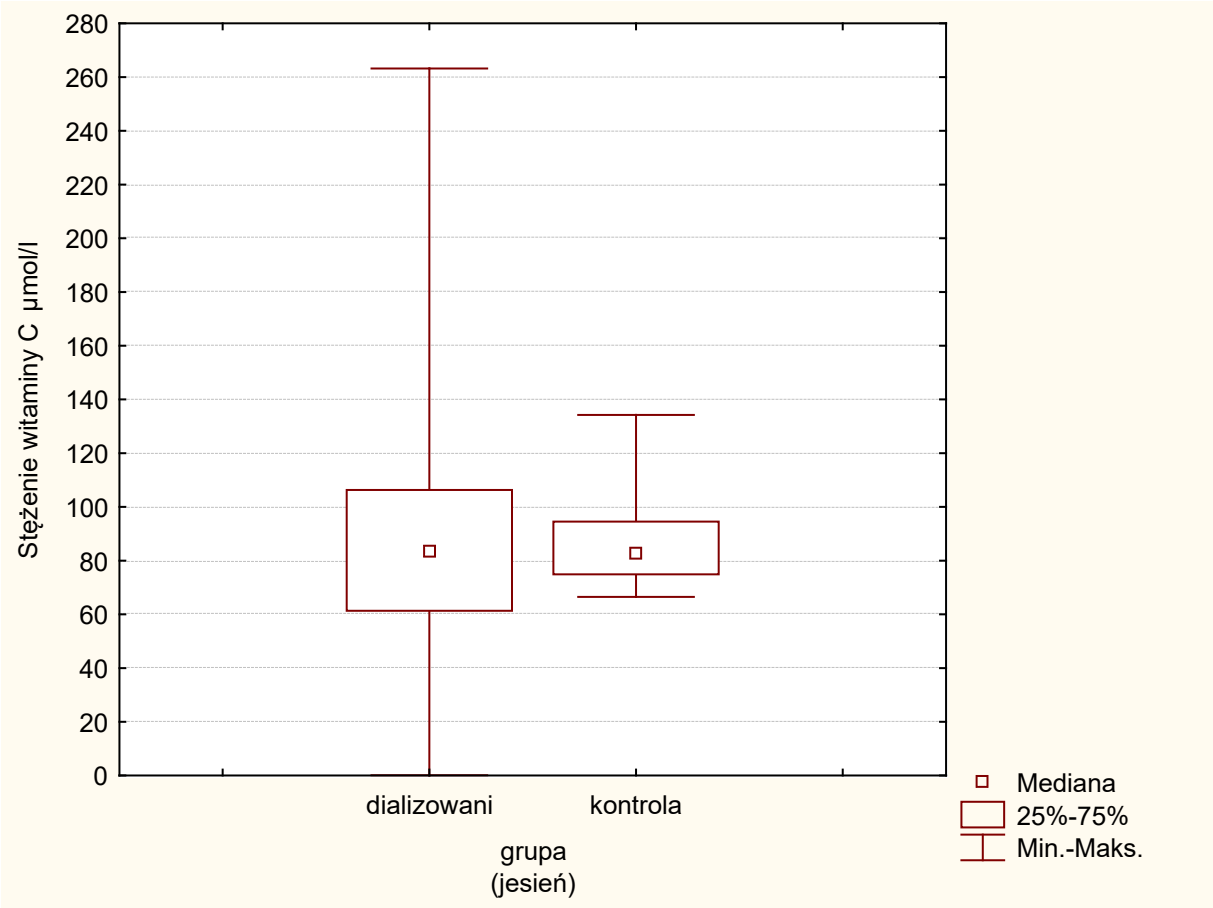
Rycina 5. Różnice w stężeniach witaminy C pomiędzy chorymi dializowanymi i grupą kontrolą po 3 miesiącach obserwacji (zima; $p<0,001$; $Me_{dializowani}= 12,34$ µmol/l; $Me_{kontrola} = 55,54$ µmol/l).



Rycina 6. Różnice w stężeniach witaminy C pomiędzy chorymi dializowanymi i grupą kontrolą po 6 miesiącach obserwacji (wiosna; p<0,001; $Me_{dializowani}$= 6,78 µmol/l; $Me_{kontrola}$ = 39,44 µmol/l).



Rycina 7. Różnice w stężeniach witaminy C pomiędzy chorymi dializowanymi i grupą kontrolą po 9 miesiącach obserwacji (lato; p<0,005; $Me_{dializowani}$= 45,46 µmol/l; $Me_{kontrola}$ = 65,69 µmol/l).



Rycina 8. Różnice w stężeniach witaminy C pomiędzy chorymi dializowanymi i grupą kontrolą po 12 miesiącach obserwacji (jesień; p – NS; $Me_{dializowani}$= 83,23 µmol/l; $Me_{kontrola}$ = 82,92 µmol/l).

Stosując test Kołmogorowa-Smirnowa (tabele XI, XII i XIII), nie stwierdzono znamiennie statystycznie różnic w stężeniach witaminy C pomiędzy niepalącymi (n=100) i palącymi w całej badanej populacji (n=35). Różnice takie nie występowały również pomiędzy niepalącymi (n=81) i palącymi (n=31) w obrębie grupy chorych dializowanych i niepalącymi (n=19) i palącymi (n=4) w obrębie grupy kontrolnej. W teście Kołmogorowa-Smirnowa nie stwierdzono również znamiennych statystycznie różnic w stężeniach witaminy C pomiędzy mężczyznami i kobietami w całej badanej populacji. Różnice takie nie występowały także pomiędzy mężczyznami i kobietami w obrębie badanych grup (tabele XIV, XV i XVI).

Tabela XI. Stężenia witaminy C u palących i niepalących w całej badanej populacji.

Okres badania	Pory roku	P	Średnia palący (µmol/l)	Średnia niepalący (µmol/l)	Odch. std palący (µmol/l)	Odch. std niepalący (µmol/l)
Początek	jesień	p > 0,1	31,75	38,52	36,53	35,19
3 mies.	zima	p > 0,1	27,98	28,12	24,36	29,62
6 mies.	wiosna	p > 0,1	17,91	15,11	17,90	15,10
9 mies.	lato	p > 0,1	55,61	49,03	33,40	24,27
12 mies.	jesień	p > 0,1	90,07	80,11	38,44	34,46

Tabela XII. Stężenia witaminy C u palących i niepalących w grupie chorych dializowanych.

Okres badania	Pory roku	P	Średnia palący (µmol/l)	Średnia niepalący (µmol/l)	Odch. std palący (µmol/l)	Odch. std niepalący (µmol/l)
Początek	jesień	p > 0,1	18,63	31,59	24,35	32,58
3 mies.	zima	p > 0,1	18,51	24,34	18,08	29,21
6 mies.	wiosna	p > 0,1	11,57	10,47	12,68	10,61
9 mies.	lato	p > 0,1	53,37	47,53	36,26	25,54
12 mies.	jesień	p > 0,1	90,40	79,11	42,35	37,41

Tabela XIII. Stężenia witaminy C u palących i niepalących w grupie kontrolnej.

Okres Badania	Pory roku	P	Średnia palący (µmol/l)	Średnia niepalący (µmol/l)	Odch. std palący (µmol/l)	Odch. std niepalący (µmol/l)
Początek	jesień	p > 0,1	90,06	81,86	21,18	12,79
3 mies.	zima	p > 0,1	59,38	48,94	13,78	25,55
6 mies.	wiosna	p > 0,1	39,90	35,97	16,05	15,79
9 mies.	lato	p > 0,1	65,62	58,40	11,07	12,01
12 mies.	jesień	p > 0,1	88,90	85,60	20,26	7,35

Tabela XIV. Stężenia witaminy C w zależności od płci wszystkich badanych (chorzy dializowani i grupa kontrolna).

Okres badania	Pory roku	P	Średnia kobiety (µmol/l)	Średnia mężczyźni (µmol/l)	Odch. std kobiety (µmol/l)	Odch. std mężczyźni (µmol/l)
Początek	jesień	p > 0,1	40,54	28,28	39,50	33,07
3 mies.	zima	p > 0,1	31,22	25,72	24,82	26,06
6 mies.	wiosna	p > 0,1	21,13	14,39	19,52	14,93
9 mies.	lato	p > 0,1	57,27	51,88	31,30	31,68
12 mies.	jesień	p > 0,1	94,56	83,18	31,97	40,43

Tabela XV. Stężenia witaminy C w zależności od płci u chorych dializowanych.

Okres badania	Pory roku	P	Średnia kobiety (µmol/l)	Średnia mężczyźni (µmol/l)	Odch. std kobiety (µmol/l)	Odch. std mężczyźni (µmol/l)
Początek	jesień	P > 0,1	21,71	21,73	28,42	26,33
3 mies.	zima	P > 0,1	17,27	21,44	16,84	23,54
6 mies.	wiosna	P > 0,1	11,12	11,43	11,04	12,88
9 mies.	lato	P > 0,1	53,90	50,89	35,96	32,99
12 mies.	jesień	P > 0,1	99,34	81,96	37,10	42,16

Tabela XVI. Stężenia witaminy C w zależności od płci w grupie kontrolnej.

Okres badania	Pory roku	P	Średnia kobiety (µmol/l)	Średnia mężczyźni (µmol/l)	Odch. std kobiety (µmol/l)	Odch. std mężczyźni (µmol/l)
Początek	jesień	P > 0,1	87,00	91,93	18,92	23,12
3 mies.	zima	p > 0,1	56,50	60,00	14,82	19,94
6 mies.	wiosna	p > 0,1	41,15	35,14	17,35	11,84
9 mies.	lato	p > 0,1	65,71	61,30	11,24	11,76
12 mies.	jesień	p > 0,1	85,97	93,30	17,71	20,53

Stosując test Kołmogorowa-Smirnowa (tabela XVII) nie stwierdzono również znamiennych statystycznie różnic w stężeniach witaminy C w kolejnych badaniach u chorych, dializowanych powyżej i poniżej 2 lat.

Tabela XVII. Stężenia witaminy C w grupie chorych dializowanych powyżej i poniżej 2 lat.

Okres badania	Pory roku	P	Średnia stężenia witaminy C (µmol/l) dializa >2 lat	Średnia stężenia witaminy C (µmol/l) dializa <2 lat	Odch. std dializa >2 lat	Odch. std dializa >2 lat
Początek	jesień	p > 0,10	21,61	22,15	28,04	22,64
3 mies.	zima	p > 0,10	18,33	28,56	18,02	33,74
6 mies.	wiosna	p > 0,10	11,24	11,76	11,54	16,14
9 mies.	lato	p > 0,10	52,64	48,12	33,41	37,31
12 mies.	jesień	p > 0,10	86,47	94,26	41,07	43,52

5.1.2. Spadek stężeń witaminy C podczas zabiegu hemodializy.

Korelacje pomiędzy redukcją stężenia witaminy C podczas hemodializy a badanymi parametrami: ultrafiltracją, Kt/V, kreatyniną, transferyną, iPTH, albuminą i ferrytyną przedstawiono w tabelach XVIII – XXVI (początek obserwacji – jesień; 3 mies. obserwacji – zima; 6 mies. obserwacji – wiosna; 9 mies. obserwacji – lato; 12 mies. obserwacji - jesień).

Nie stwierdzono znamiennej statystycznie korelacji (w teście korelacji rang Spearmana) pomiędzy spadkiem stężenia witaminy C podczas zabiegu hemodializy a następującymi parametrami: ultrafiltracją (tab. XVIII), Kt/V (tab. XIX) oraz stężeniem kreatyniny (tab. XX).

Nie stwierdzono również znamiennej statystycznie korelacji (w teście korelacji rang Spearmana) pomiędzy przeddializacyjnym stężenia witaminy C a: Kt/V (tab. XXI), spadkiem stężenia kreatyniny podczas hemodializy (tab. XXII), saturacją transferyny (tab. XXIII), iPTH (tab. XXIV), stężeniem albumin (tab. XXV) oraz stężeniem ferrytyny (tab. XXVI).

Tabela XVIII. Korelacje pomiędzy spadkiem stężenia witaminy C podczas hemodializy a ultrafiltracją w kolejnych badaniach.

Okres badania	Pory roku	R	t(N-2)	p
Początek	jesień	-0,06	-0,620193	0,537
3 mies.	zima	-0,07	-0,603380	0,548
6 mies.	wiosna	-0,05	-0,556870	0,586
9 mies.	lato	-0,10	-0,676850	0,497
12 mies.	jesień	-0,11	-0,740370	0,463

Tabela XIX. Korelacje pomiędzy spadkiem poziomu witaminy C podczas hemodializy a Kt/V w kolejnych badaniach.

Okres badania	Pory roku	R	t(N-2)	p
Początek	jesień	0,07	0,629415	0,531
3 mies.	zima	0,10	0,535438	0,490
6 mies.	wiosna	0,08	0,578222	0,531
9 mies.	lato	0,09	0,496797	0,54
12 mies.	jesień	0,06	0,441104	0,661

Tabela XX. Korelacje pomiędzy spadkiem stężenia witaminy C podczas hemodializy a spadkiem stężenia kreatyniny w kolejnych badaniach.

Okres badania	Pory roku	R	t(N-2)	p
Początek	jesień	-0,16	-1,38753	0,169
3 mies.	zima	-0,09	-0,87746	0,276
6 mies.	wiosna	-0,10	-0,94343	0,247
9 mies.	lato	-0,14	-1,21245	0,175
12 mies.	jesień	-0,17	-1,43566	0,101

Tabela XXI. Korelacje pomiędzy przeddializacyjnym stężeniem witaminy C a Kt/V.

Okres badania	Pory roku	R	t(N-2)	p
Początek	jesień	-0,14	-1,43535	0,165
3 mies.	zima	-0,03	-0,34355	0,563
6 mies.	wiosna	-0,11	-0,98943	0,235
9 mies.	lato	-0,05	-0,56570	0,422
12 mies.	jesień	0,14	1,01213	0,274

Tabela XXII. Korelacje pomiędzy przeddializacyjnym stężeniem witaminy C a spadkiem stężenia kreatyniny podczas hemodializy.

Okres badania	Pory roku	R	t(N-2)	p
Początek	jesień	0,10	1,05323	0,290
3 mies.	zima	0,05	0,54892	0,423
6 mies.	wiosna	0,07	0,84553	0,345
9 mies.	lato	-0,01	-0,23244	0,645
12 mies.	jesień	0,12	1,00361	0,265

Tabela XXIII. Korelacje pomiędzy przeddializacyjnym stężeniem witaminy C a saturacją transferyny.

Okres badania	Pory roku	R	t(N-2)	p
Początek	jesień	-0,08	-0,713350	0,478
3 mies.	zima	-0,09	-0,786347	0,434
6 mies.	wiosna	0,10	0,785672	0,435
9 mies.	lato	-0,03	-0,456589	0,673
12 mies.	jesień	-0,11	-0,753987	0,455

Tabela XXIV. Korelacja pomiędzy przeddializacyjnym stężeniem witaminy C a iPTH.

Okres badania	Pory roku	R	t(N-2)	p
Początek	jesień	0,10	1,065556	0,289

Tabela XXV. Korelacje pomiędzy przeddializacyjnym stężeniem witaminy C a stężeniem albumin.

Okres badania	Pory roku	R	t(N-2)	p
Początek	jesień	0,06	0,593283	0,555
3 mies.	zima	0,15	1,273364	0,207
6 mies.	wiosna	-0,03	-0,271266	0,787
9 mies.	lato	-0,02	-0,197302	0,844
12 mies.	jesień	-0,02	-0,197302	0,844

Tabela XXVI. Korelacje pomiędzy przeddializacyjnym stężeniem witaminy C a stężeniem ferrytyny.

Okres badania	Pory roku	R	t(N-2)	p
Początek	jesień	0,02	0,080418	0,937
3 mies.	zima	-0,11	-0,749942	0,457
6 mies.	wiosna	0,18	1,494519	0,140
9 mies.	lato	0,06	0,34725	0,673
12 mies.	jesień	0,03	0,165059	0,870

5.1.3. Analiza ankiet dietetycznych.

W analizie porównywano wyniki uzyskane z badań ankietowych u 30 (16 M, 14 K) chorych dializowanych i 20 (6 M i 14 K) ochotników z grupy kontrolnej. Przedstawiono je w tabeli XXVII. Ze względu na brak rozkładu normalnego ($p<0,05$ w teście Shapiro-Wilka dla większości zmiennych) w analizie statystycznej wykorzystano testy nieparametryczne, a zmienne przedstawiono jako medianę, rozstęp międzykwartylowy i zakres (minimum-maksimum).

Średnia ilość spożywanej dobowo witamy C w grupie chorych dializowanych wynosiła w I kwartale (wiosna) – 86,9 mg, w II kwartale (lato) wynosiła – 69,3 mg, w kwartale III (jesień) – 75,5 mg, a kwartale IV (zima) – 69,3 mg/dobę. Najniższa średnia ilość spożywanej witaminy C występowała w II kwartale (lato) i w kwartale IV (zima), wynosząca w obu okresach – 69,3 mg/dobę. Najwyższe spożycie witaminy C występowało na wiosnę – 86,9 mg (tab. XXVII).

Średnia ilość spożytej dobowo witaminy C w grupie kontrolnej wynosiła w I kwartale (wiosna) 113,0 mg, w II kwartale (lato) wynosiła – 155,9 mg, w III kwartale (jesień) – 92,8 mg, a kwartale IV (zima) – 95,8 mg. Najniższa średnia ilość spożytej witaminy C występowała w III kwartale (jesień) – 92,8 mg. Najwyższe średnie spożycie witaminy C występowało w lecie – 155,9 mg (tab. XXVII).

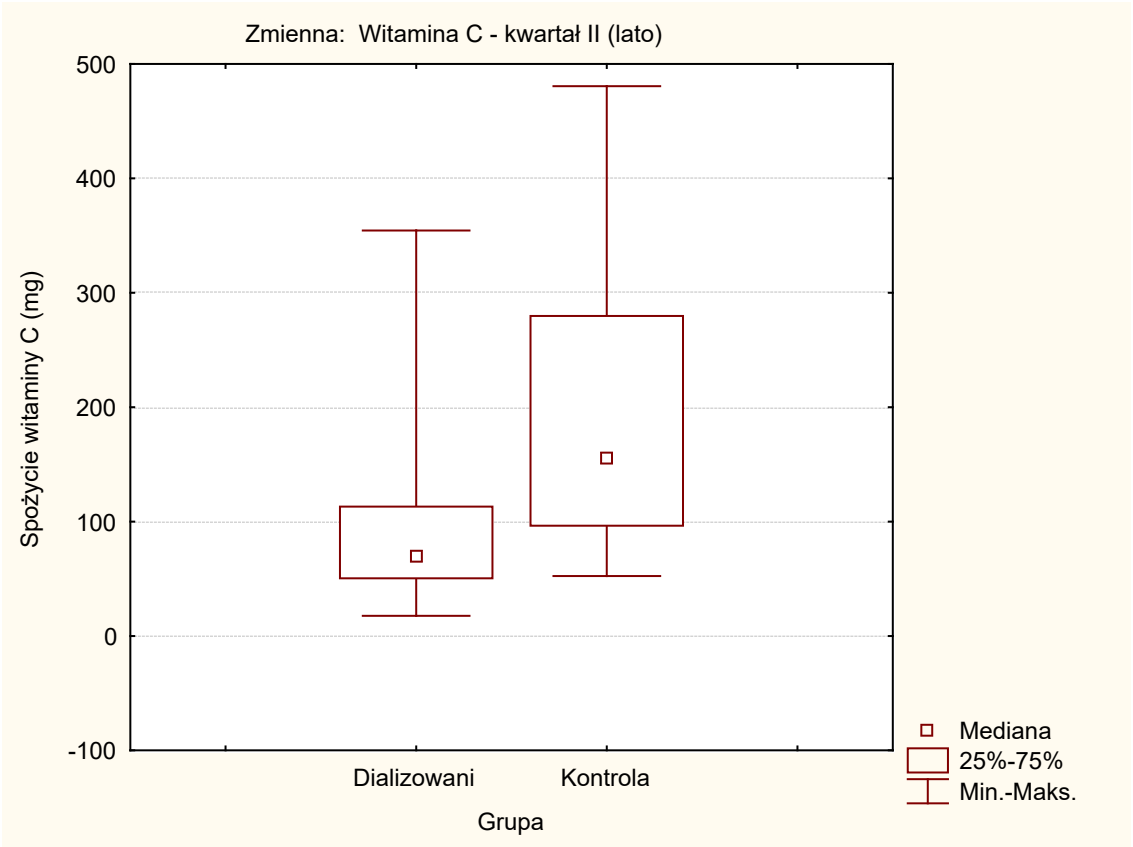
Średnia ilość spożywanego dobowo potasu w grupie chorych dializowanych wynosiła w I kwartale (wiosna) – 1048,9 mg, w II kwartale (lato) wynosiła – 1009,5 mg, w kwartale III (jesień) – 1219,4 mg, a kwartale IV (zimie) – 1112,5 mg. Najniższe średnie spożycie potasu występowało w II kwartale (lato) – 1009,5 mg. Najwyższe średnie spożycie potasu występowało w jesieni – 1219,4 mg (tab. XXVII).

Średnia ilość spożytego dobowo potasu w grupie kontrolnej wynosiła w I kwartale (wiosna) - 1099,6 mg, w II kwartale (lato) wynosiła –1303,4 mg, w kwartale III (jesień) – 974,1 mg, a kwartale IV (zima) – 1122,0 mg. Najniższe średnie spożycie potasu występowało w III kwartale (jesień) – 974,1 mg. Najwyższe średnie spożycie potasu występowało w lecie – 1303,4 mg (tab. XXVII).

Tabela XXVII. Średnia ilość spożytego dobowo potasu i witaminy C w badanych grupach (dializowani i grupa kontrolna na podstawie danych uzyskanych z ankiet dietetycznych) oraz czasokres dializowania.

	Dializowani				Grupa kontrolna			
	Mediana	Min	Maks	Rozstęp	Mediana	Min	Maks	Rozstęp
Czasokres dializowania (w miesiącach)	48,0	0,0	162,0	44,00				
Kwartał I (wiosna)								
Potas (mg)	1048,9	330,0	1944,7	470,07	1099,6	558,6	2618,9	484,60
Witamina C (mg)	86,9	22,2	229,1	64,69	113,0	35,6	238,4	86,02
Kwartał II (lato)								
Potas (mg)	1009,5	317,0	3948,3	336,23	1303,4	713,0	2443,5	1020,25
Witamina C (mg)	69,3	17,7	354,6	62,59	155,9	52,5	480,7	183,34
Kwartał III (jesień)								
Potas (mg)	1219,4	391,4	4905,1	685,36	974,1	343,7	1788,9	572,51
Witamina C (mg)	75,5	28,2	396,6	51,57	92,8	28,1	267,6	74,20
Kwartał IV (zima)								
Potas (mg)	1112,5	433,4	1966,4	402,77	1122,0	624,2	2617,0	265,37
Witamina C (mg)	69,3	30,4	197,6	42,10	95,8	48,9	237,9	66,30

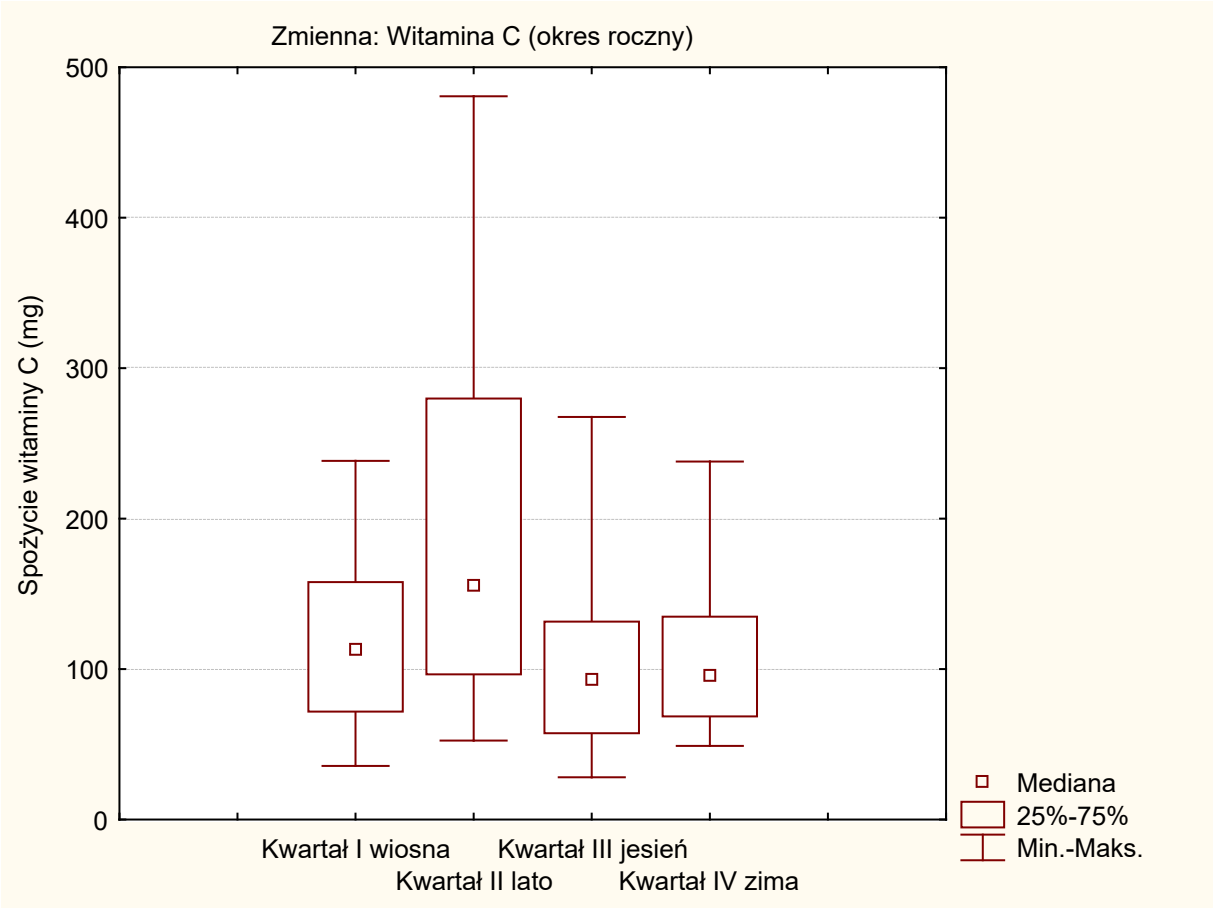
W teście Kołmogorowa-Smirnowa znamiennie statystycznie różnice w spożyciu pomiędzy chorymi dializowanymi i grupą kontrolną ($p<0,01$) wykazywano w przypadku: witaminy C – w kwartale II (lato) (wyższe u grupy kontrolnej), potasu – w kwartale III (jesień) (wyższe u chorych dializowanych!). Wyniki przedstawiono na rycinach 9 i 10.



Rycina 9. Różnice w średniej ilości spożycia witaminy C pomiędzy chorymi dializowanymi i grupą kontrolną.

Rycina 10. Różnice w średniej ilości spożycia potasu pomiędzy chorymi dializowanymi i grupą kontrolną w kwartale III (jesień).

W populacji kontrolnej w kolejnych kwartałach stwierdzono znamienne statystycznie ($p<0,05$ test ANOVA Friedmana) różnice spożycia witaminy C (ryc. 11). Najniższa średnia ilość spożytej witaminy C występowała w III kwartale (jesień). Najwyższe średnie spożycie witaminy C występowało w II kwartale (lato).



Rycina 11. Różnice w średniej ilości spożycia witaminy C w populacji kontrolnej w kolejnych kwartałach (kwartał I – wiosna; kwartał II – lato; kwartał III – jesień; kwartał IV - zima).

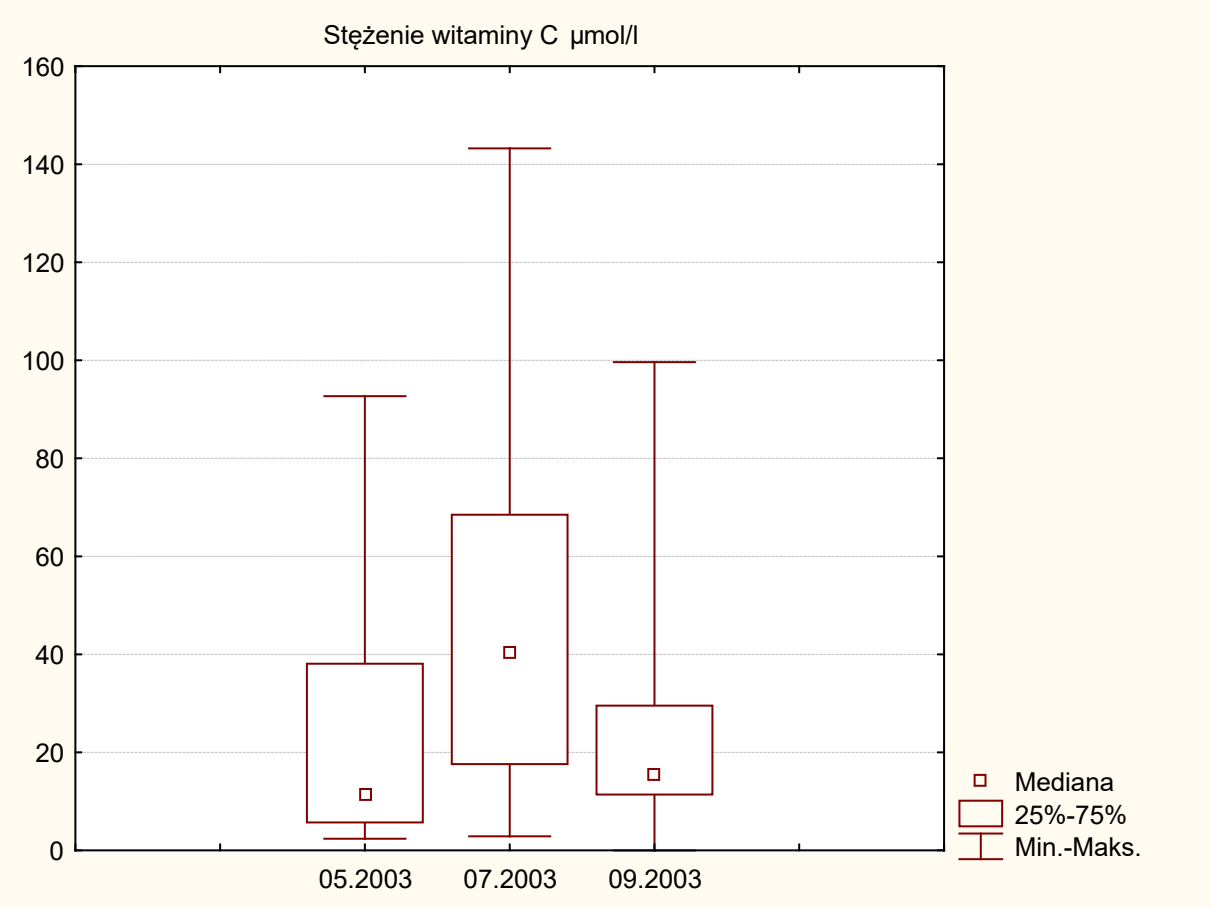
Nie stwierdzono (w teście Kołomogorowa-Smirnowa) znamiennych statystycznie różnic w spożyciu badanych substancji pomiędzy mężczyznami (n=22) i kobietami (n=28), oraz pomiędzy niepalącymi (n=41) i palącymi (n=9).

5.2. Analiza stężeń witaminy C podczas dwumiesięcznej suplementacji – II etap; drugi rok badania.

W analizie porównywano wyniki uzyskane u 68 chorych dializowanych (42 mężczyzn tj. 61,8%, 26 kobiet tj. 38,2%) (wcześniej wyłączono z obserwacji 2 chorych z powodu pojawienia się uczucia kwaśności w jamie ustnej). W tej grupie badanych nie stwierdzono niedoboru kwasu foliowego ani witaminy B_{12}. Stężenia iPTH powyżej 800 pg/ml wykazano u 10 chorych (17,2 %). Poziom toksyczny glinu (> 50 µg/l) stwierdzono u 8 chorych

hemodializowanych (11,8 %). W związku z faktem, iż niniejsza praca miała charakter interwencyjno–obserwacyjny, chorych tych nie dyskwalifikowano z dalszego badania.

Ze względu na brak rozkładu normalnego ($p<0,05$ w teście Shapiro-Wilka dla większości zmiennych), w analizie statystycznej wykorzystano testy nieparametryczne, a zmienne przedstawiono jako medianę, rozstęp międzykwartylowy i zakres (minimum-maksimum).

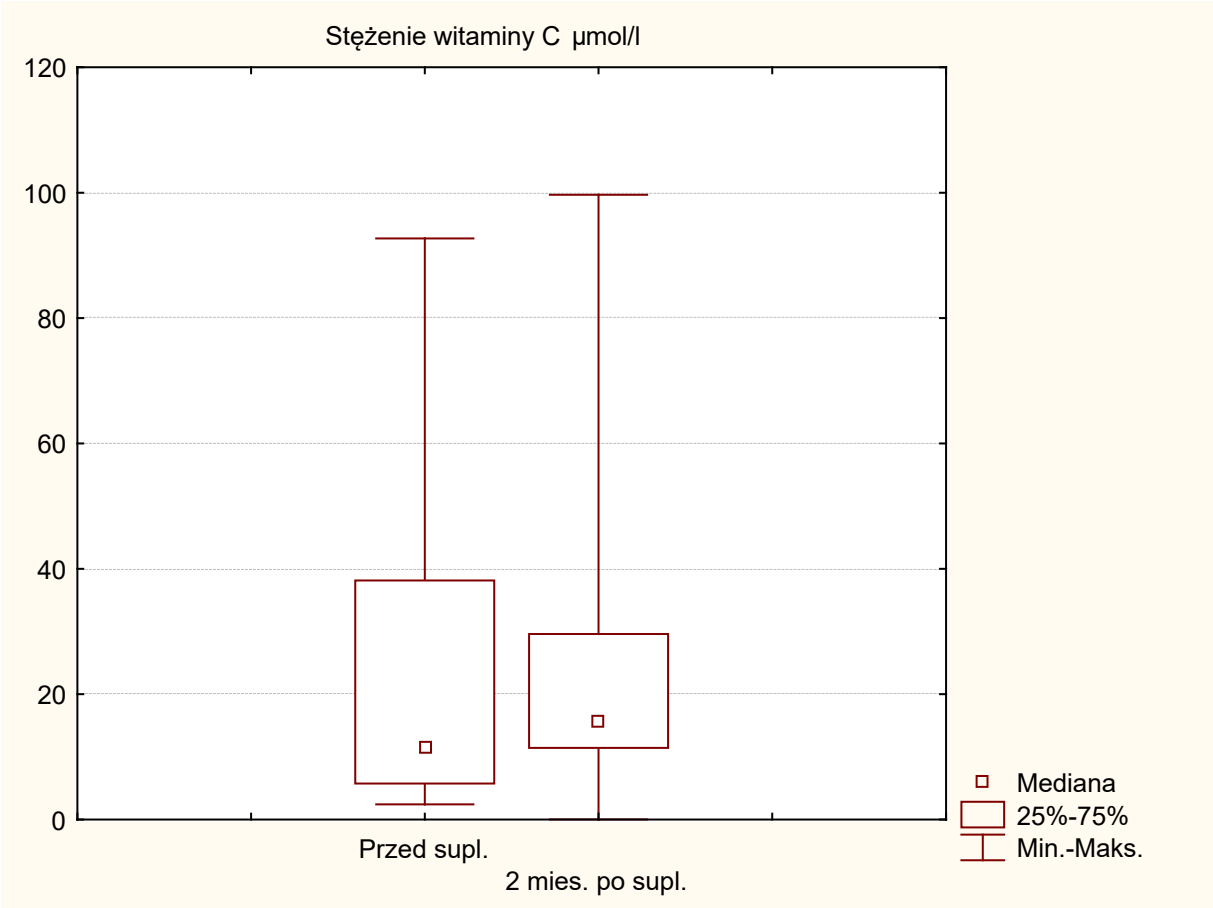


Rycina 12. Stężenia witaminy C przed suplementacją, po dwóch miesiącach jej stosowania oraz dwa miesiące po zakończeniu u chorych dializowanych w II etapie, drugiego roku badania.

Po okresie suplementacji stężenie witaminy C w badanej populacji wzrosło znamiennie statystycznie ($p<0,00002$ w teście Wilcoxona). Po dwóch miesiącach od zakończenia suplementacji witaminy C jej stężenie powróciło do wartości zbliżonych do wyjściowych (p - NS) (ryc. 13, 14).

W teście ANOVA Friedmana stwierdzono istotne statystycznie różnice ($p<0,00001$) pomiędzy stężeniami witaminy C po okresie suplementacji (wzrost stężenia) i po jej odstawieniu (spadek stężenia) (ryc. 12).

Rycina 13. Stężenia witaminy C przed i po suplementacji u chorych dializowanych w II etapie, drugiego roku badania.



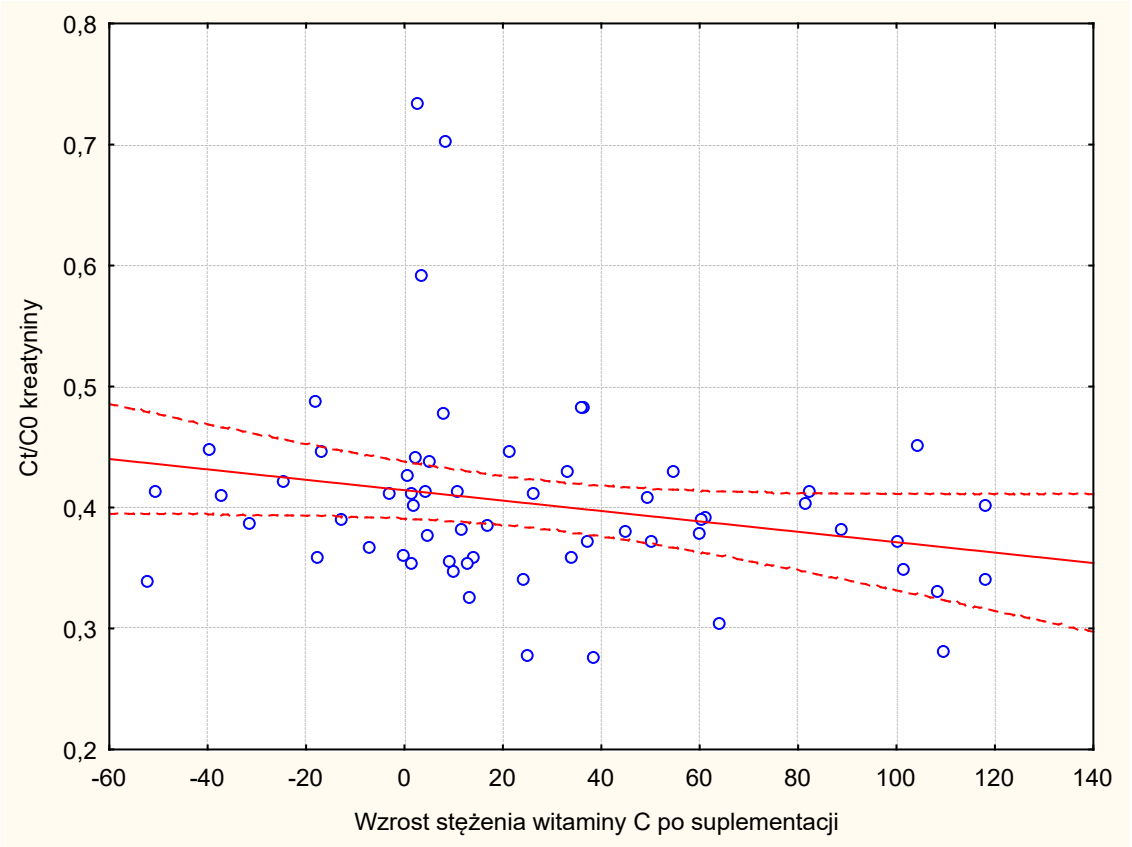
Rycina 14. Stężenia witaminy C przed i dwa miesiące po zakończeniu suplementacji u chorych dializowanych w II etapie, drugiego roku badania.

Tabela XXVIII. Analiza opisowa wzrostu stężenia witaminy C po suplementacji u chorych dializowanych w II etapie, drugiego roku badania.

	Mediana	Minimum	Maksimum	Rozstęp
Wzrost stężenia witaminy C	13,10039	-52,1686	118,2413	48,85022

Tabela XXIX. Korelacje pomiędzy wzrostem stężenia witaminy C po suplementacji a badanymi parametrami w grupie chorych dializowanych.

Zmienna	R	t(N-2)	p
iPTH	0,02	0,169445	0,866
Stężenie glinu	0,01	0,068262	0,946
Kt/V	0,21	1,645052	0,105
Ct/C0 kreatyniny	**-0,28**	**-2,20200**	**0,032**



Rycina 15. Korelacja pomiędzy przyrostem stężenia witaminy C i stopniem wydializowania kreatyniny u chorych dializowanych w II etapie, drugiego roku badania.

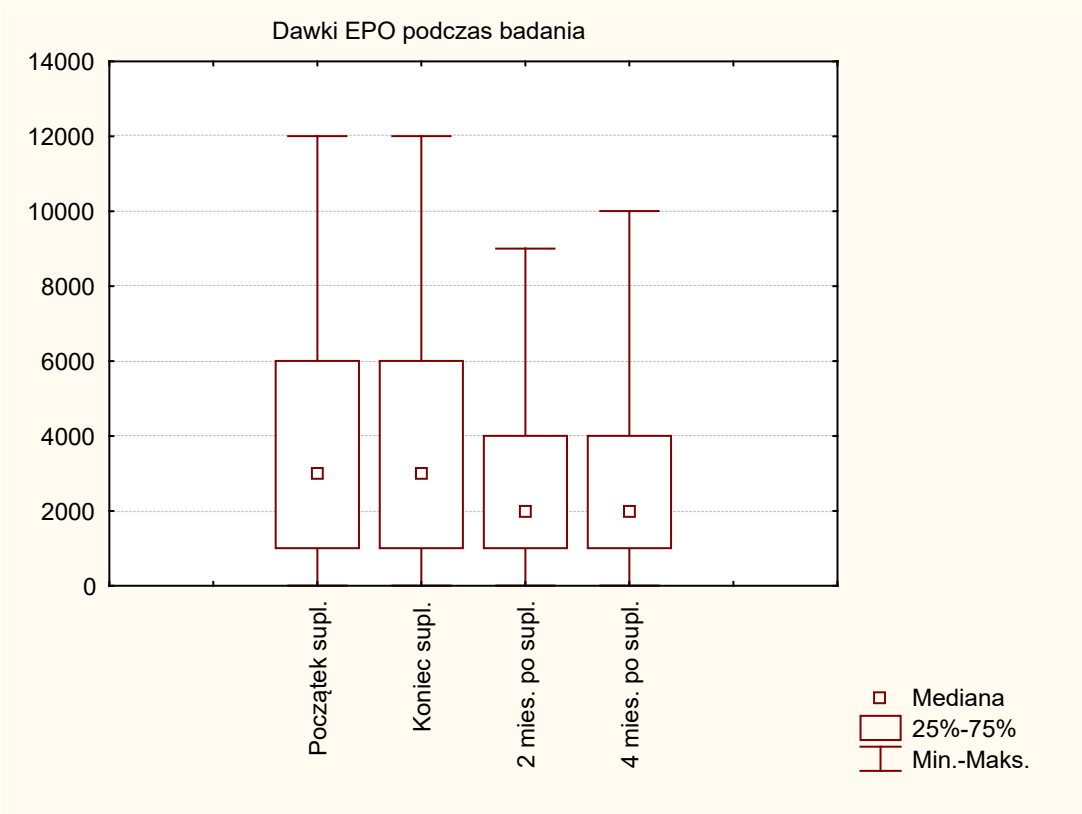
Nie stwierdzono znamiennej statystycznie korelacji (w teście korelacji rang Spearmana) pomiędzy wzrostem stężenia witaminy C po suplementacji a średnim stężeniem iPTH, stężeniem glinu i średnią wartością Kt/V w badanym okresie (tab. XXIX). Stwierdzono natomiast znamienną, statystycznie ujemną korelację pomiędzy przyrostem stężenia witaminy C a stopniem wydializowania kreatyniny (Ct/C0) (ryc. 15).

Tabela XXX. Wpływ infekcji* w okresie suplementacji na wzrost stężenia witaminy C u chorych dializowanych w II etapie, drugiego roku badania.

	p	Średnia (infekcja)	Średnia (bez infekcji)	Odch. std (infekcja)	Odch. std (bez infekcji)
Stężenie witaminy C (µmol/l)	> 0,10	25,65531	29,83459	41,79657	51,86192

Nie stwierdzono wpływ infekcji w okresie suplementacji na wzrost stężenia witaminy C podczas jej trwania (p – NS; test Kołmogorowa-Smirnowa) (tab. XXX).

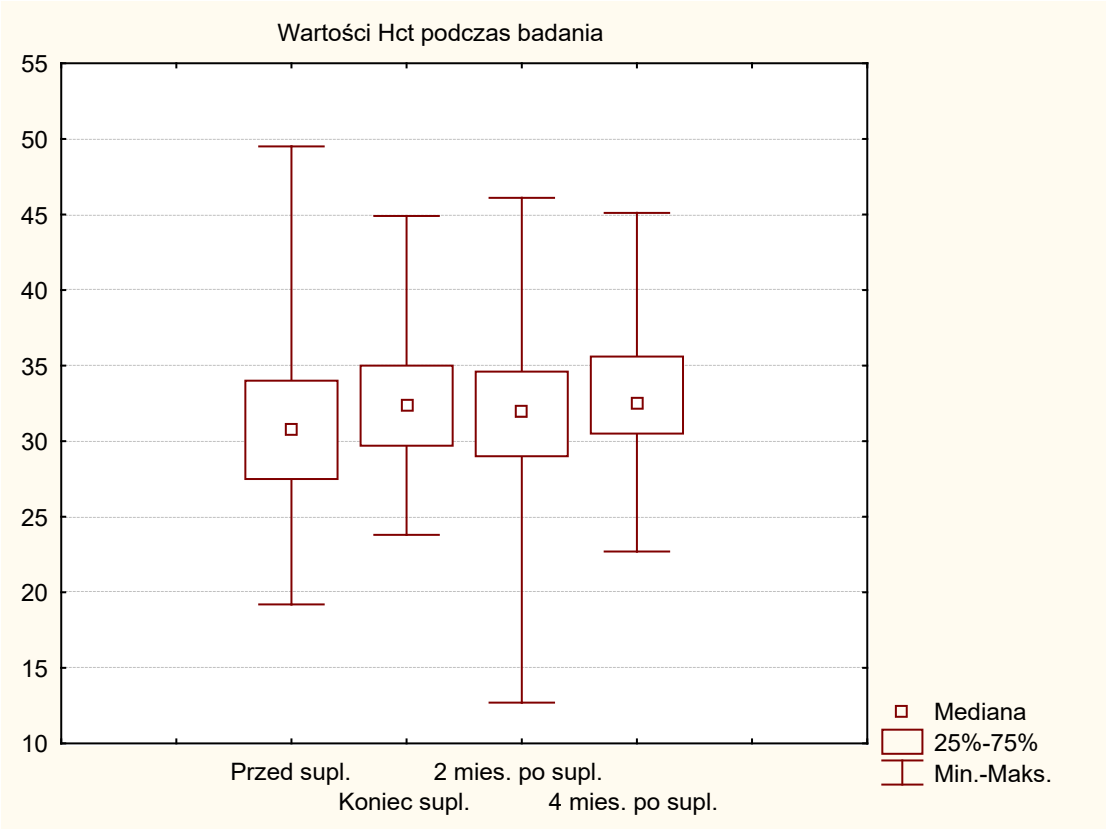
* W niniejszym badaniu przyjęto założenie podaży antybiotyku p.o. lub i.v. w przypadku pojawienia się objawów infekcji uzasadniających rozpoczęcie leczenia; tj. wzrost temperatury powyżej 38,0 ˚C, kaszlu ze zmianami w kontrolnym badaniu RTG płuc lub innych zmian wskazujących na obecność aktywnego stanu zapalnego.



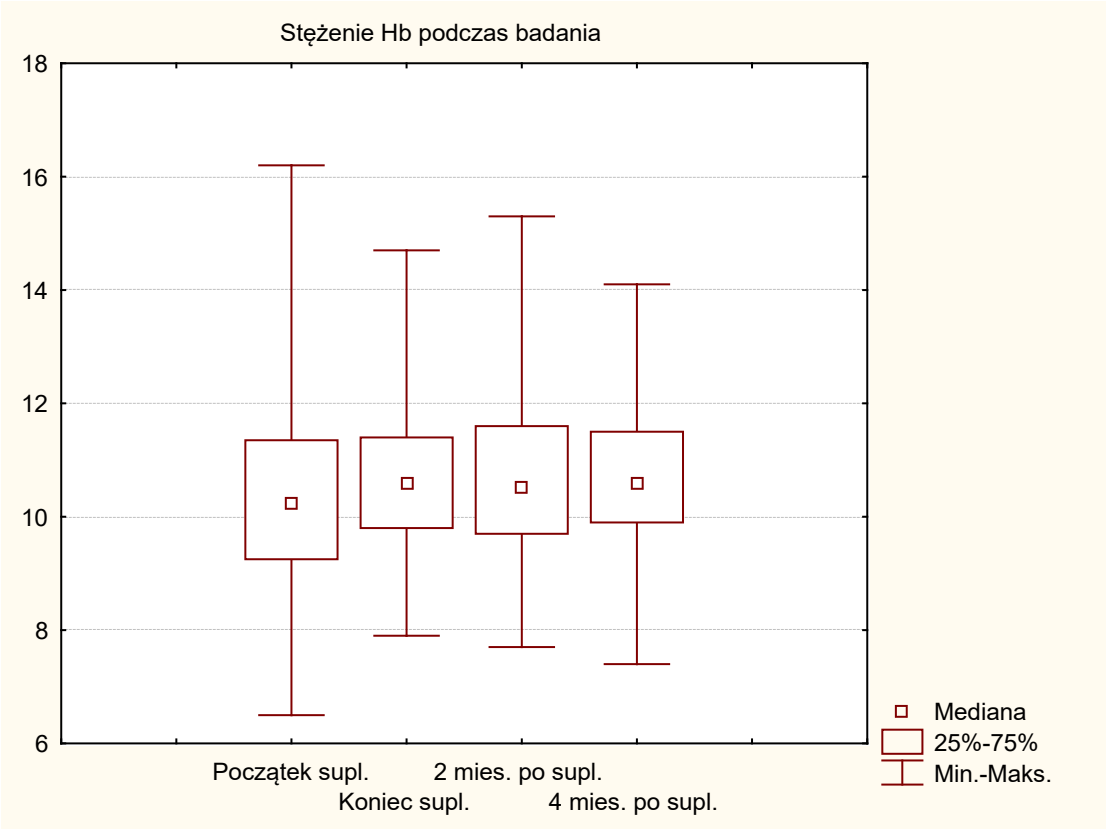
Rycina 16. Dawkowanie rHuEPO - j./tydzień/pacjenta podczas suplementacji oraz w 2 i 4 miesiące po jej zakończeniu u chorych dializowanych w II etapie, drugiego roku badania.

W teście ANOVA Friedmana stwierdzono istotne statystycznie różnice ($p<0,00001$) w dawkowaniu erytropoetyny w okresie suplementacji oraz w 2 oraz 4 miesiące po jej zakończeniu (ryc. 16).

Jednocześnie w teście ANOVA Friedmana stwierdzono istotny statystycznie wzrost ($p<0,00001$) wartość średnich hematokrytu i stężenia hemoglobiny po okresie suplementacji oraz w 2 i 4 miesiące po jej zakończeniu (ryc. 17 i 18).



Rycina 17. Zachowanie się wartości hematokrytu (Hct) podczas badania u chorych dializowanych w II etapie, drugiego roku badania.

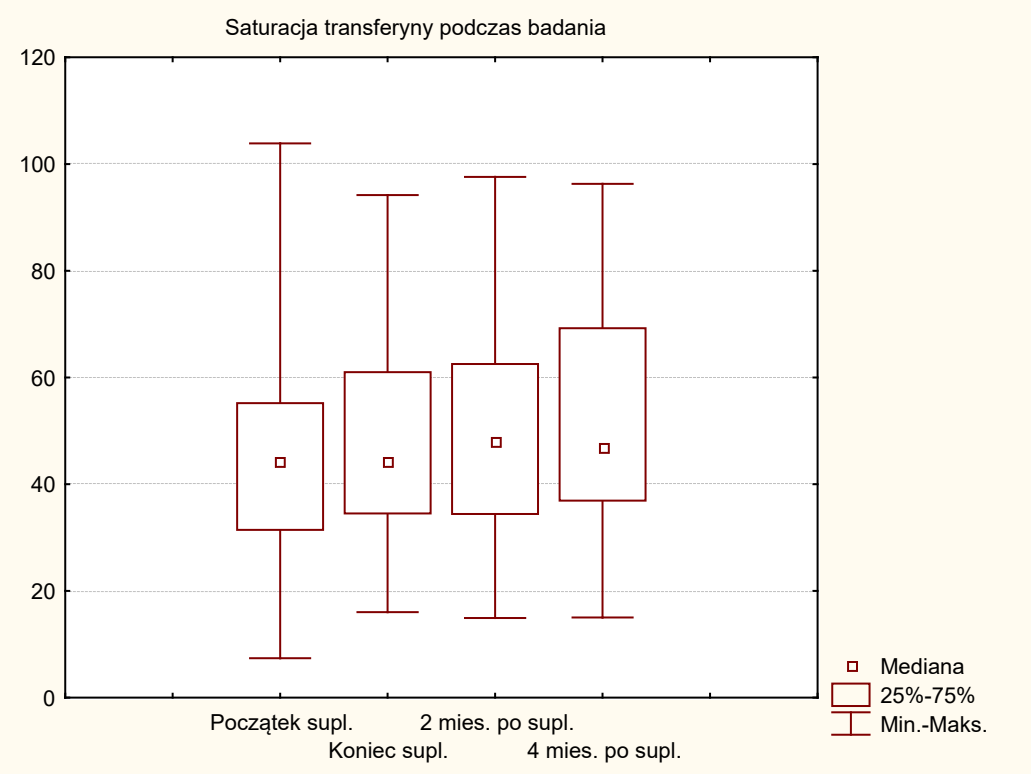


Rycina 18. Zachowanie się stężenia hemoglobiny (Hb) u chorych dializowanych w II etapie, drugiego roku badania.

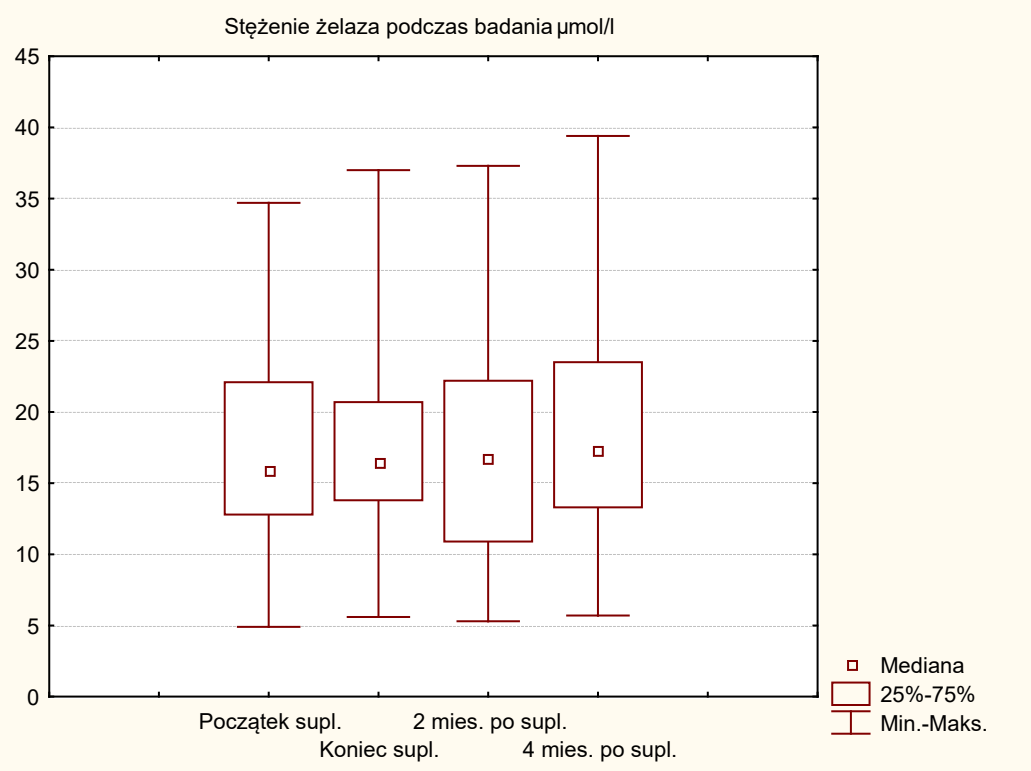
Nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie zmian wartości MCV po okresie suplementacji witaminy C w stosunku do wartości uzyskanych na początku badania.

Podobnie stężenia ferrytyny nie zmieniły się istotnie podczas suplementacji oraz w 2 i 4 miesiące po jej zakończeniu (p – NS test ANOVA Friedmana).

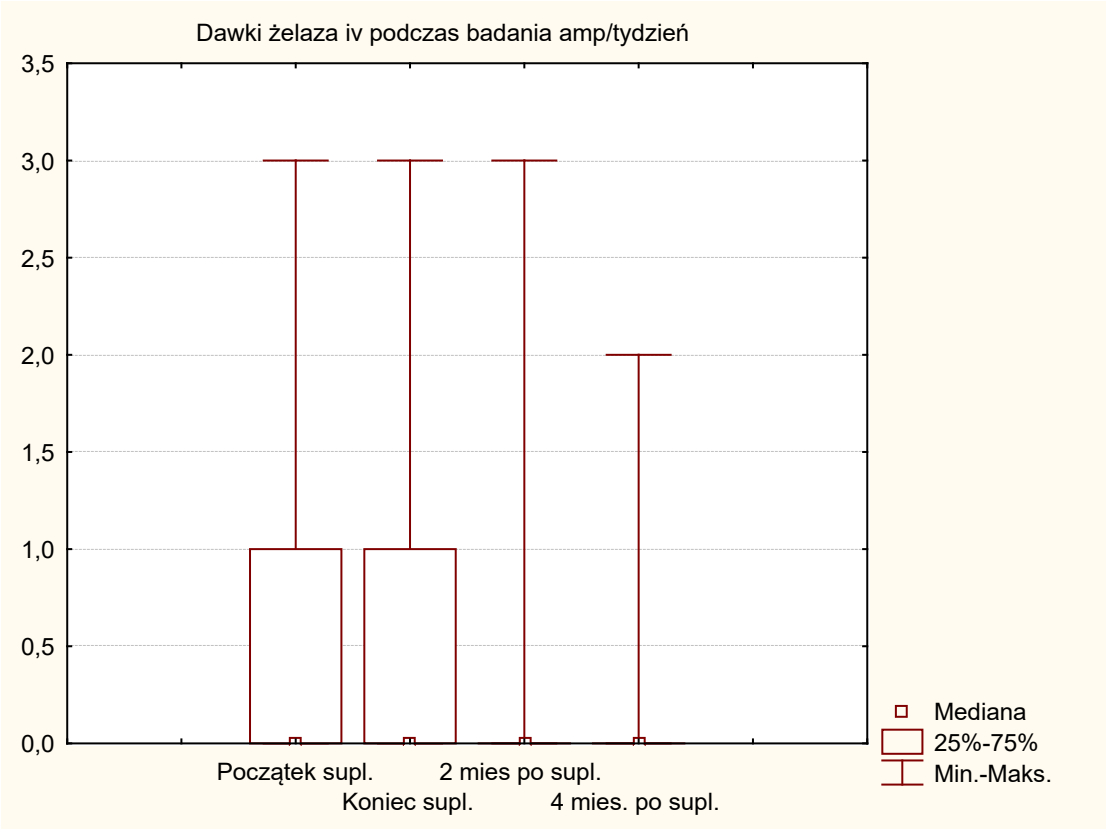
Jednocześnie w teście ANOVA Friedmana stwierdzono istotny statystycznie wzrost ($p<0,05$) saturacji transferyny i osoczowego stężenia żelaza po okresie suplementacji oraz w 2 i 4 miesiące po jej zakończeniu, przy jednocześnie znamiennie ($p<0,05$) zmniejszonym jego dawkowaniu (ryc. 19, 20, 21).



Rycina 19. Saturacja transferyny u chorych dializowanych w II etapie, drugiego roku badania.

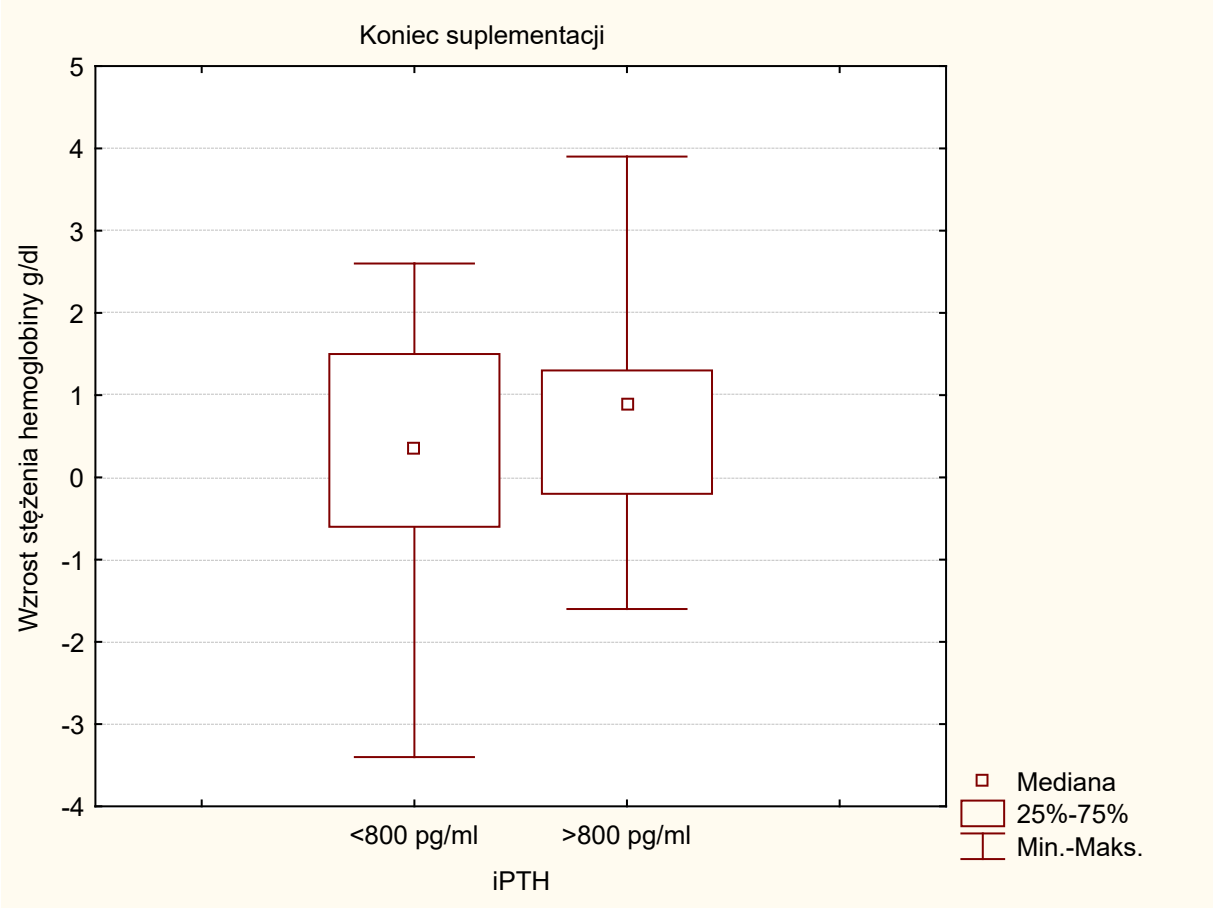


Rycina 20. Stężenie żelaza w surowicy u chorych dializowanych w II etapie, drugiego roku badania.

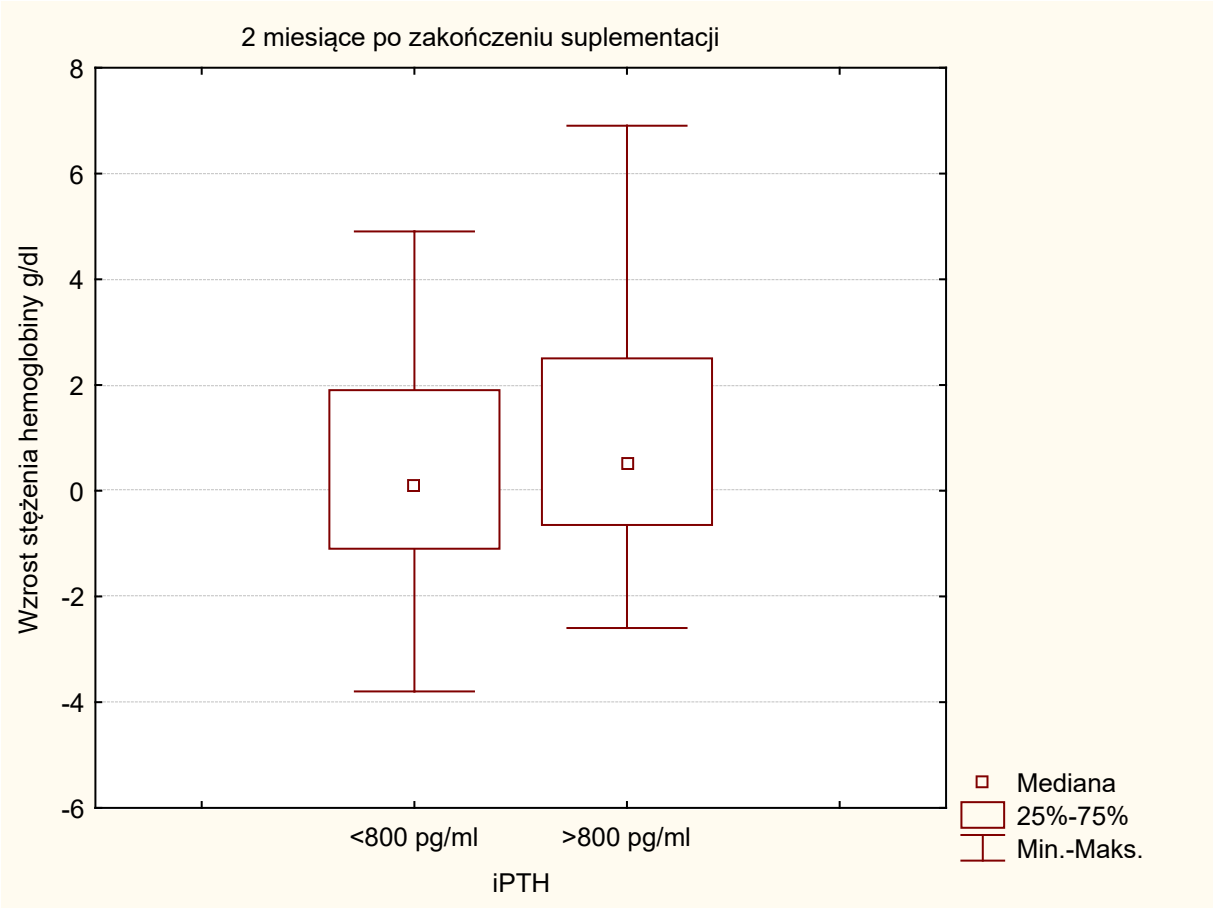


Rycina 21. Dawki żelaza u chorych dializowanych w II etapie, drugiego roku badania.

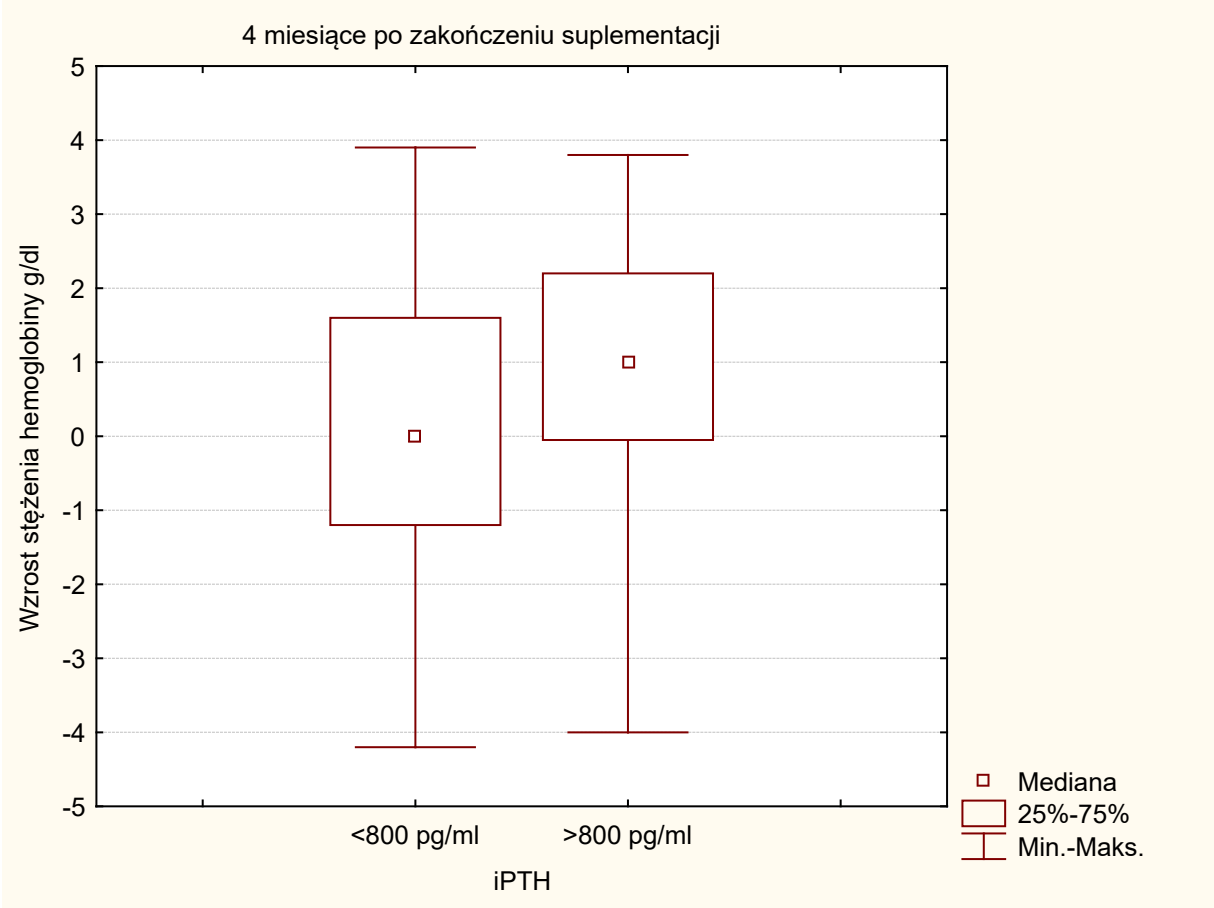
W teście Manna-Whitney'a zmiany stężenia hemoglobiny po suplementacji witaminy C w stosunku do wartości przed suplementacją nie różniły się pomiędzy grupami pacjentów bez i z ciężką nadczynnością przytarczyc w momencie zakończenia suplementacji (ryc. 22), w 2 miesiące po jej zakończeniu (ryc. 23) i w 4 miesiące po jej zakończeniu (ryc. 24).



Rycina 22. Zmiany stężenia hemoglobiny u chorych dializowanych w II etapie, drugiego roku badania w momencie zakończenia suplementacji witaminy C w stosunku do wartości przed suplementacją w zależności od wartości iPTH.

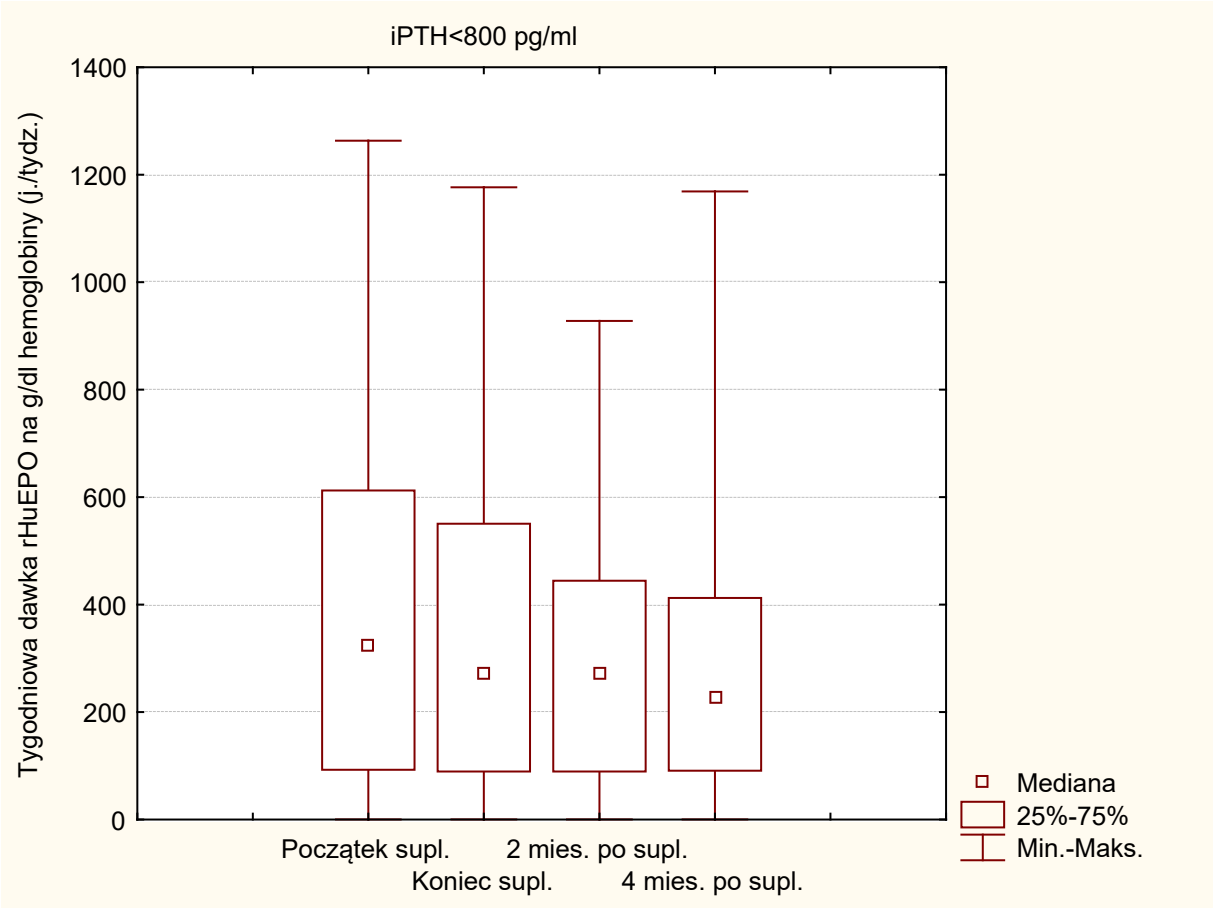


Rycina 23. Zmiany stężenia hemoglobiny u chorych dializowanych w II etapie, drugiego roku badania w 2 miesiące po zakończeniu suplementacji witaminy C w stosunku do wartości przed suplementacją.

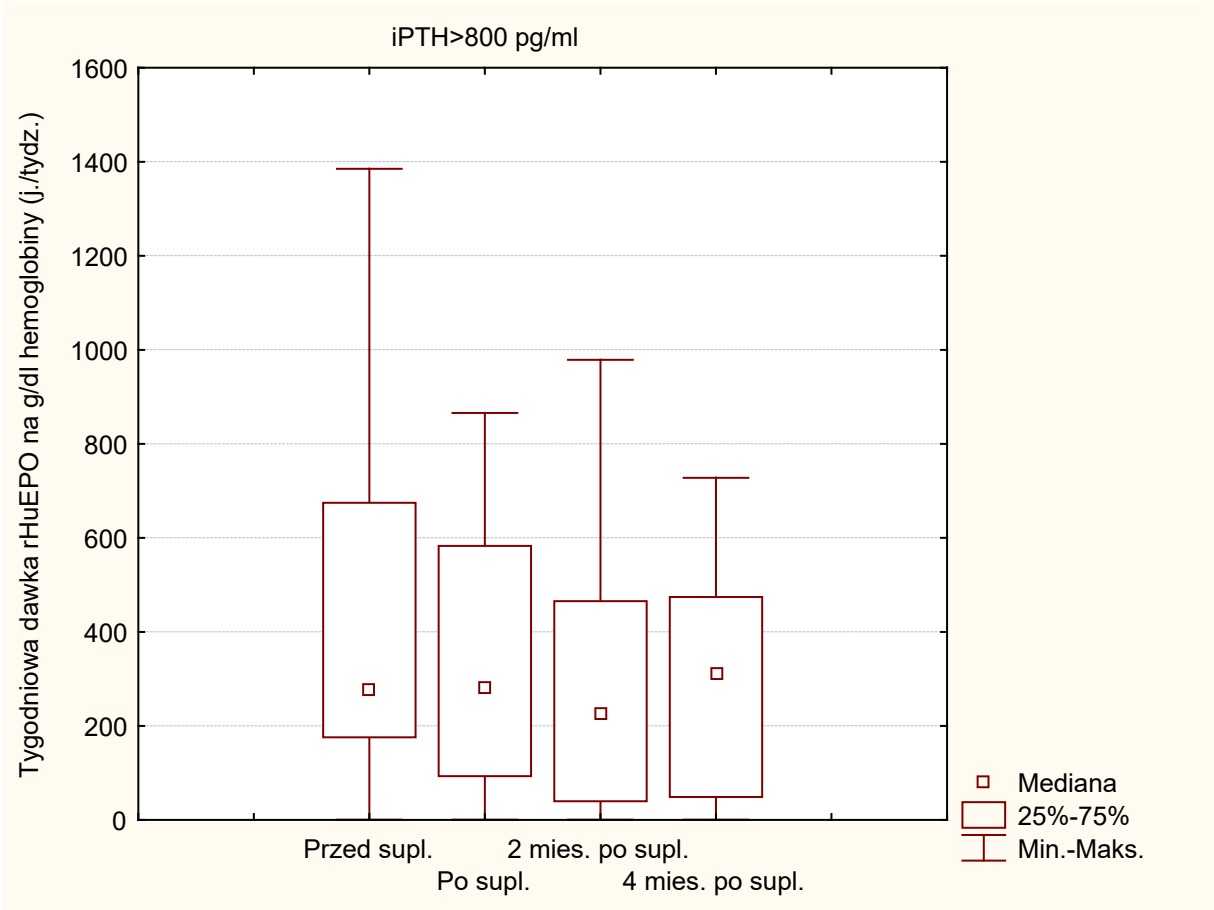


Rycina 24. Zmiany stężenia hemoglobiny u chorych dializowanych w II etapie, drugiego roku badania w 4 miesiące po zakończeniu suplementacji witaminy C w stosunku do wartości przed suplementacją w zależności od wartości iPTH.

W teście ANOVA Friedmana nie stwierdzono znamiennych statystycznie różnic w dawkowaniu rHuEPO potrzebnym do uzyskania wzrostu o 1 g/dl stężenia hemoglobiny w grupach pacjentów z poziomem iPTH poniżej i powyżej 800 pg/ml od rozpoczęcia suplementacji witaminy C do 4 miesięcy po zakończeniu suplementacji. Dawki rHuEPO potrzebne do uzyskania wzrostu wartości o 1 g/dl hemoglobiny nie różniły się pomiędzy chorymi z wartości iPTH powyżej i poniżej 800 pg/ml we wszystkich miesiącach obserwacji (ryc. 25 i 26).



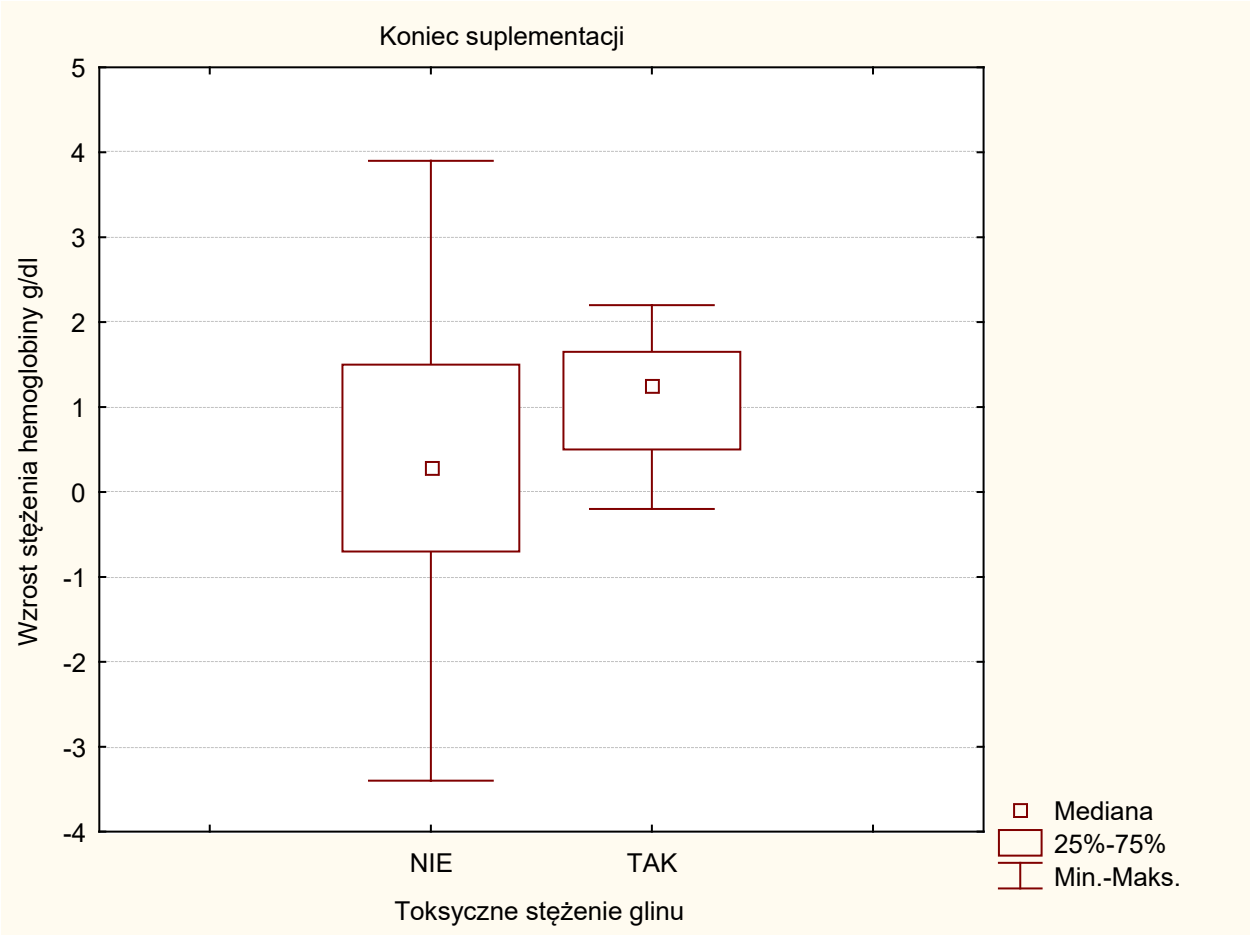
Rycina 25. Tygodniowe dawki rHuEPO na g/dl hemoglobiny u chorych z iPTH<800 pg/ml na początku i końcu suplementacji witaminy C oraz w 2 i 4 miesiące po jej zakończeniu.



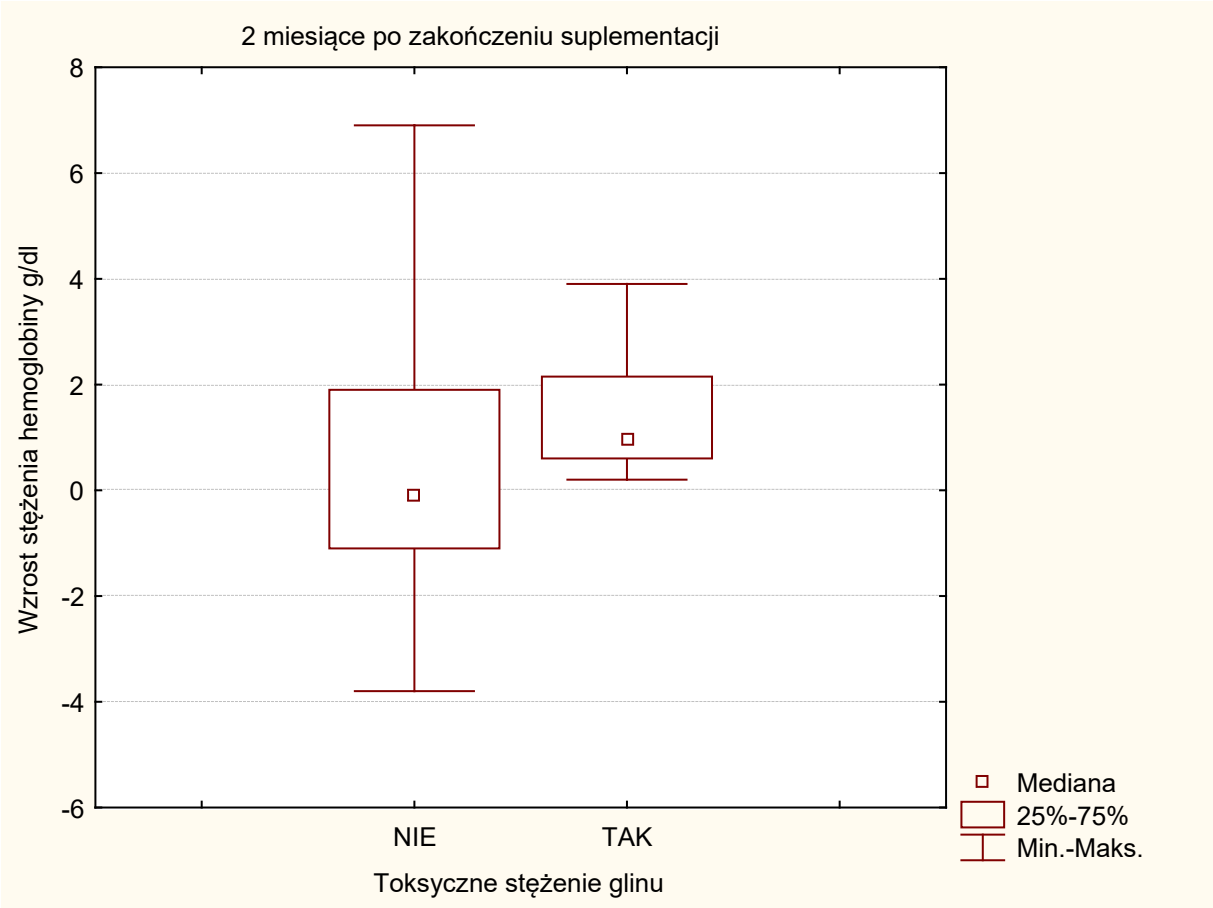
Rycina 26. Tygodniowe dawki rHuEPO na g/dl hemoglobiny u chorych z iPTH>800 pg/ml na początku i końcu suplementacji witaminy C oraz w 2 i 4 miesiące po jej zakończeniu.

W teście Manna-Whitney'a zmiany stężenia hemoglobiny po suplementacji witaminy C w stosunku do wartości przed suplementacją nie różniły się pomiędzy grupami pacjentów bez i z toksycznym poziomem glinu w momencie zakończenia suplementacji (ryc. 27) i w 2 miesiące po jej zakończeniu (ryc. 28).

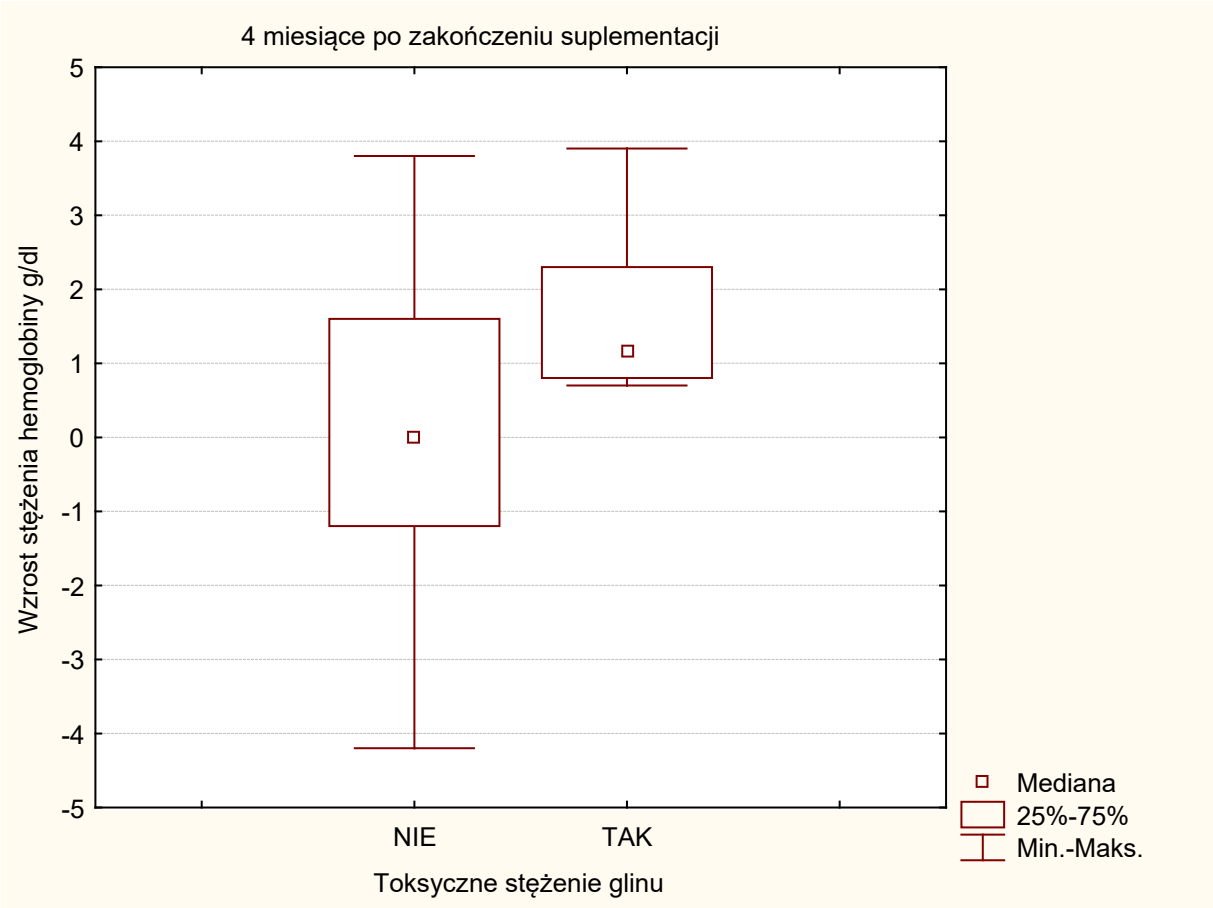
W 4 miesiące zakończeniu suplementacji wzrost stężenia hemoglobiny był znamiennie statystycznie ($p<0,003$) większy w grupie chorych z toksycznym poziomem glinu (ryc. 29).



Rycina 27. Zmiany stężenia hemoglobiny w momencie zakończenia suplementacji witaminy C w stosunku do wartości przed suplementacją w zależności od toksycznego stężenia glinu.

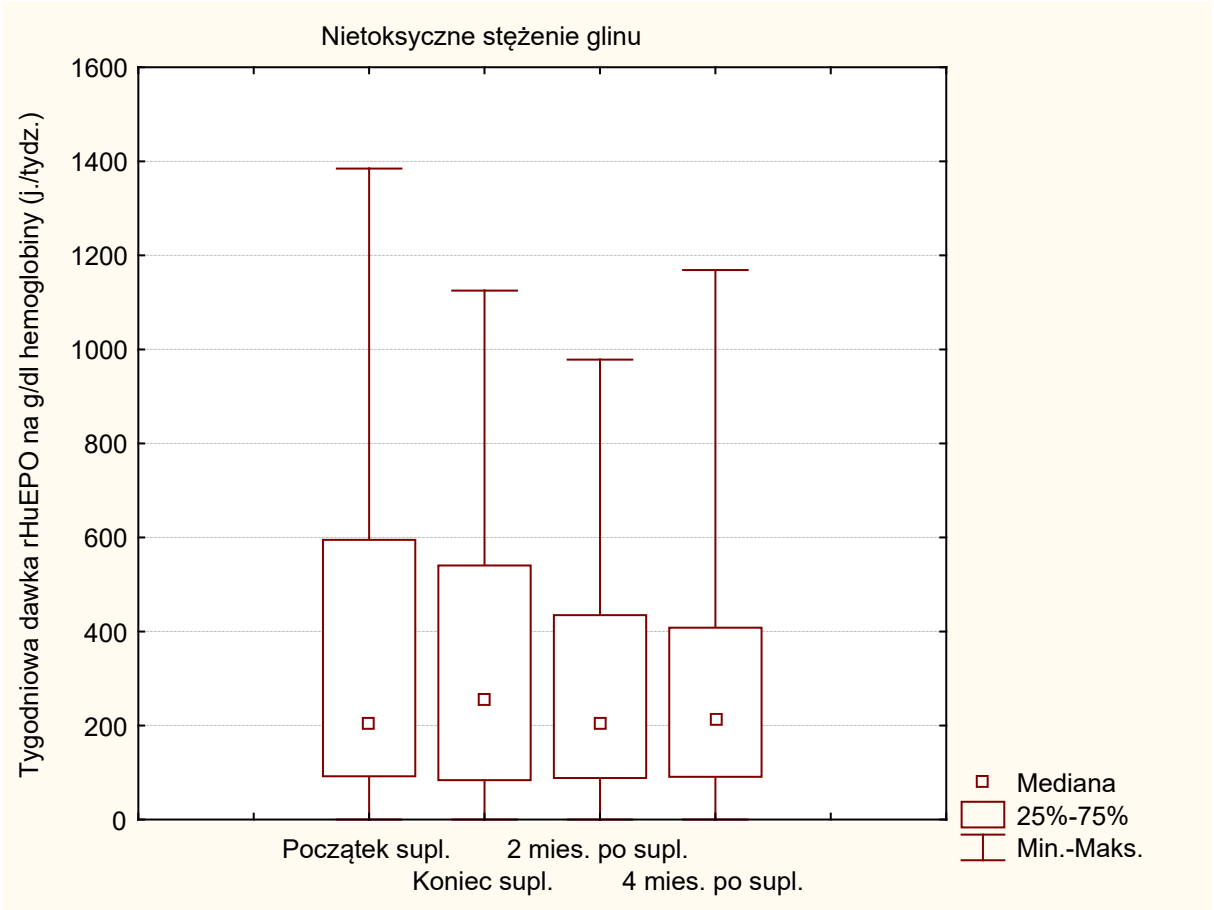


Rycina 28. Zmiany stężenia hemoglobiny 2 miesiące po zakończeniu suplementacji witaminy C w stosunku do wartości przed suplementacją w zależności od toksycznego stężenia glinu.



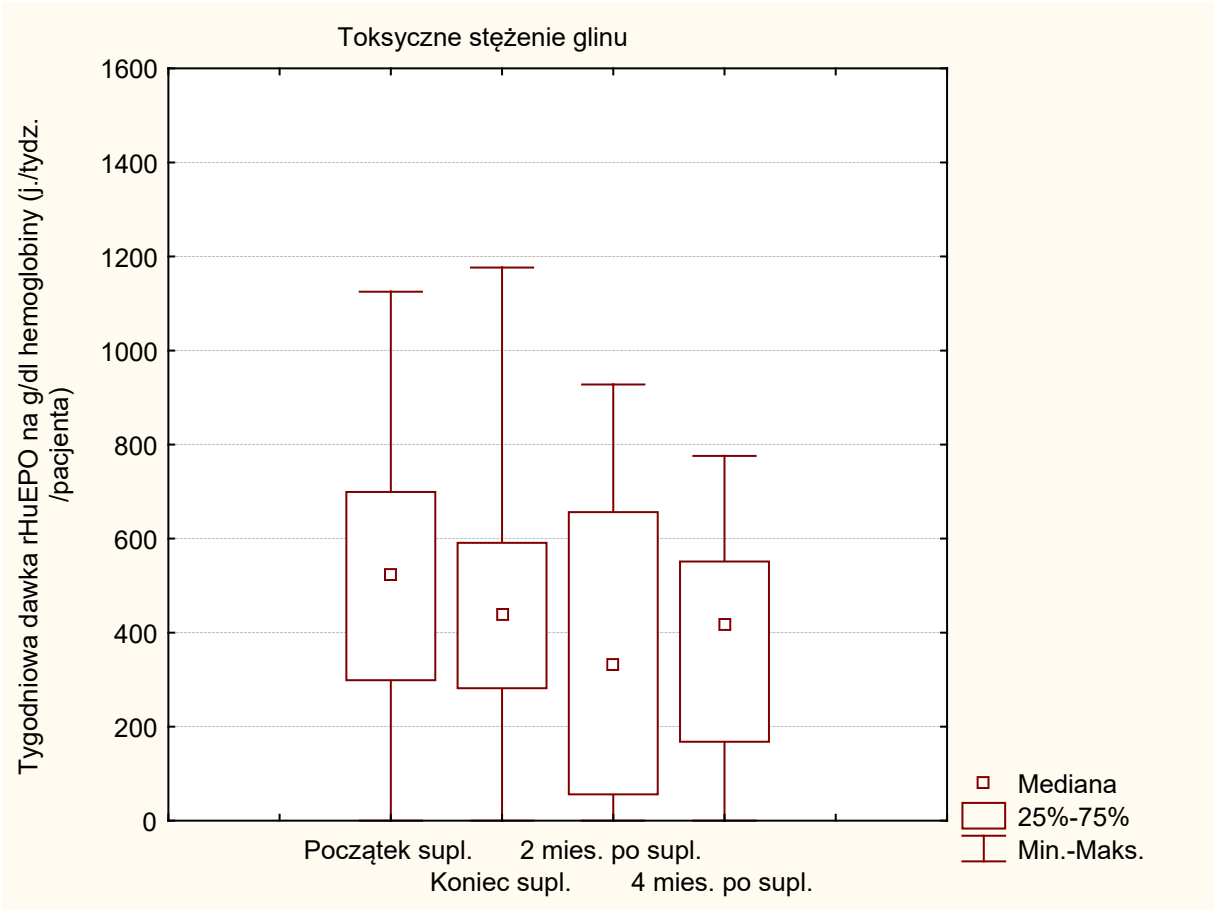
Rycina 29. Zmiany stężenia hemoglobiny 4 miesiące po zakończeniu suplementacji witaminy C w stosunku do wartości przed suplementacją w zależności od toksycznego stężenia glinu.

W teście ANOVA Friedmana nie stwierdzono znamiennych statystycznie różnic w dawkowaniu rHuEPO potrzebnym do uzyskania wzrostu o 1 g/dl stężenia hemoglobiny w grupach pacjentów z nietoksycznym i toksycznym poziomem glinu od rozpoczęcia suplementacji witaminy C do 4 miesięcy po zakończeniu suplementacji (ryc. 30).



Rycina 30. Tygodniowe dawki rHuEPO na g/dl hemoglobiny u chorych z nietoksycznym stężeniem glinu na początku i końcu suplementacji witaminy C oraz w 2 i 4 miesiące po jej zakończeniu.

Chorzy z toksycznym stężeniem glinu wymagali w stosunku do chorych z nietoksycznym poziomem glinu większych dawek rHuEPO w celu uzyskania 1 g/dl hemoglobiny we wszystkich miesiącach obserwacji, jednak różnice te nie były znamienne statystycznie (ryc. 31).



Rycina 31. Tygodniowe dawki rHuEPO na g/dl hemoglobiny u chorych z toksycznym stężeniem glinu na początku i końcu suplementacji witaminy C oraz w 2 i 4 miesiące po jej zakończeniu.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono znamiennie niższe stężenia witaminy C (poniżej normy) w grupie chorych hemodializowanych w porównaniu do grupy referencyjnej osób zdrowych. Podczas zabiegu hemodializy stężenie witaminy C w surowicy chorych hemodializowanych obniża się o około 45%. Nie stwierdzono statystycznie znamiennej korelacji pomiędzy spadkiem stężenia witaminy C podczas zabiegu hemodializy a następującymi parametrami: ultrafiltracją, wskaźnikiem Kt/V oraz stężeniem kreatyniny.

U pacjentów hemodializowanych, mimo zalecanej podaży witaminy C (60 mg/dobę), jej stężenie w surowicy utrzymywało się zawsze poniżej normy, z obserwowanym znaczącym spadkiem jej stężenia w surowicy w okresie wiosennym.

U osób zdrowych osiągnięto zalecaną podaż witaminy C (60 mg/dobę). W okresie jesieni i zimy wyliczona na podstawie ankiet dietetycznych średnia dobowa ilość spożytej witaminy C wynosiła < 100 mg/dobę, będąc najpewniej przyczyną zmniejszenia zapasów ustrojowych i obniżenia stężenia witaminy C w surowicy do wartości poniżej normy w okresie wiosny. Sugeruje to, że proponowane przez Kallnera i wsp. zwiększenie RDA dla witaminy C do 100 mg/dobę u zdrowej populacji posiada logiczne uzasadnienie.

Potwierdzono sezonowość zmian stężenia witaminy C w obu badanych grupach, z szczególnym jego zmniejszeniem po okresie jesienno-zimowym. Za celowe działanie uznać mozna zwiększenie podaży witaminy C u osób zdrowych w wymienionym okresie.

Stwierdzono istotnie statystyczny wzrost wartości hematokrytu oraz stężenia hemoglobiny po zakończeniu suplementacji witaminy C oraz 2 i 4 miesiące później.

Stwierdzono istotnie statystyczny wzrost saturacji transferyny i stężenia żelaza w surowicy (przy jednocześnie znamiennie zmniejszonym jego dawkowaniu) po okresie suplementacji oraz 2 i 4 miesiące po zakończeniu suplementacji witaminy C.

Po okresie suplementacji witaminy C oraz 2 i 4 miesiące później stwierdzono zmniejszenie zapotrzebowania na rHuEPO z 3000 j./tydz./pacjenta do 2000 j./tydz./pacjenta, przy utrzymaniu zakładanych stężeń Hb.

Można przypuszczać, że doprowadzenie do prawidłowego stężenia witaminy C w surowicy u chorych hemodializowanych umożliwiłoby dalsze zmniejszenie dawki rHuEPO, gdyż suplementacja witaminy C podczas HD ułatwia uwalnianie zmagazynowanego żelaza i poprawia odpowiedź na leczenie erytropoetyny. Praktyczną obserwacją dokonaną w trakcie pracy jest przekonanie, że przy podaży witaminy C u pacjentów hemodializowanych powinno monitorować się jej stężenie w surowicy.

5. DYSKUSJA

Na skutek szeroko zakrojonych akcji popularyzacyjnych, programów prozdrowotnych i profilaktycznych działań w ostatniej dekadzie – na całym świecie, jak również w polskiej populacji – zmieniły się poglądy dotyczące zdrowej diety. Obecnie spożywa się znacznie więcej świeżych owoców i jarzyn, zwracając uwagę na ilość witamin – a w szczególności witamin antyoksydatywnych, jak witamina C (18, 97, 99, 115). Należy pamiętać o istniejącej w zdrowym organizmie człowieka równowadze pomiędzy reakcjami antyoksydacyjnymi a prooksydacyjnymi. Zaburzenie tej równowagi prowadzi do stanu nazywanego stresem oksydacyjnym. Wpływa on na funkcje błon cytoplazmatycznych, doprowadzając do zaburzenia ich przepuszczalności i – w końcowym efekcie - do ich depolaryzacji i do uszkodzenia DNA. Istnieje również możliwość aktywacji protoonkogenów do onkogenów, co może przyczynić się do rozwoju chorób nowotworowych. Relacje pomiędzy zmianami poziomu wytwarzania rodników tlenowych a procesami chorobowymi i zapalnymi są ściśle ze sobą powiązane. Odczyn zapalny jest reakcją ochronną organizmu, który broniąc się doprowadza do uszkodzenia własnych tkanek. W miejscu toczącego się procesu zapalnego gromadzą się aktywowane fagocyty oraz dochodzi do uwalniania reaktywnych form tlenu, co może doprowadzić do powstania stresu oksydacyjnego.

Pacjenci hemodializowani są podatni na wystąpienie niedoboru witamin rozpuszczalnych w wodzie, takich jak kwas foliowy, witamina B_{12}, witamina B_6 i witamina C, mechanizm którego przestawiono w wstępie pracy (41, 62, 72, 106, 110, 168). Niedobory witaminowe (znane i domniemane) mogą wpływać na chorobowość w grupie tych chorych. Wzrost wytwarzania wolnych rodników podczas HD z towarzyszącą redukcją wielu antyoksydantów przesuwa delikatną równowagę w stronę prooksydantów, stwarzając możliwość rozwoju stresu oksydacyjnego. Dotyczy to zwłaszcza stanów chorobowych, do których zaliczamy amyloidozę, choroby sercowo-naczyniowe, miażdżycę naczyń, choroby nowotworowe. Dołączając się do PNN – skutki stresu oksydacyjnego mogą powodować dalsze, stopniowe pogorszenie stanu klinicznego chorego. Równocześnie, nasilająca się w trakcie hemodializy utrata związków drobnocząsteczkowych, będących regulatorami enzymów bariery antyoksydacyjnej, pogłębia zaburzenia równowagi pomiędzy stanem prooksydacyjnym a antyoksydacyjnym.

W przeprowadzonych badaniach, w pierwszym roku obserwacji poddano analizie stężenia witaminy C w grupie chorych hemodializowanych i porównano je z wynikami uzyskanymi w grupie referencyjnej osób zdrowych.

Średni spadek stężenia witaminy C po HD (wyrażony w procentach) wynosił w okresie jesiennym – 50,41 %, w zimie – 69,45 %, na wiosnę – 38,94 %, a w lecie – 47,16 %. Łączny średni spadek stężenia witaminy C w surowicy po przeprowadzeniu HD kształtował się w zakresie 45,04 % (tab. VIII). Wyniki tej pracy są zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów, co potwierdza wcześniejsze spostrzeżenia o możliwości pozaustrojowej eliminacji tej witaminy na drodze HD.

Bohm i wsp., Ha i wsp. oraz Wang i wsp. w trakcie prowadzenia badań nad stężeniem witaminy C u pacjentów hemodializowanych wykazali, że po zabiegu dializy następuje zmniejszenie stężenia witaminy C o około 33 % do 50 % w stosunku do wartości wyjściowych (11, 64, 168). W okresie przeddializacyjnym stężenia witaminy C w porównaniu do przyjętych wartości prawidłowych są niskie (0 – 38 μmol/l). Wang i wsp. wykazali, że w surowicy 16 spośród 19 pacjentów stężenie kwasu askorbinowego było poniżej 23 μmol/l. Zaobserwowano ponadto, że stężenia witaminy C w surowicy kształtowały się znacznie poniżej przyjętego zakresu norm (39 – 84 μmol/l), stwierdzanego u osób zdrowych (168). Wyliczony przez Wanga i wsp. klirens dializatora dla kwasu askorbinowego był wysoki (w zakresie 190 – 272 ml/min., przy średniej wartości przepływu krwi 288 ml/min. oraz przepływie dializatu 500 ml/min.), co potwierdzało wyniki uzyskane przez innych badaczy (152). Wydaje się to w pełni uzasadnione, mając na uwadze małą masę cząsteczkową (176,14 g/mol) oraz jonowy charakter cząsteczki. Dariwal i wsp. (42) używając metody HPLC wykazali, że witamina C nie wiąże się w znaczącym stopniu z białkami osocza, co jest kolejnym czynnikiem ułatwiającym jej utratę w trakcie dializy. Wartości klirensu witaminy C pokrywają się z danymi dotyczącymi wartości klirensu kreatyniny i mocznika, które zostały określone dla dializatora *in vitro*. Rocco i wsp. (133) stwierdzili, że wartości wydalania na drodze klirensu dla witaminy C zmieniają się w zakresie 80 do 280 mg/zabieg hemodializy, Morena i wsp. – od 8 do 230 mg/zabieg (średnio 66 mg/zabieg hemodializy), co odpowiada utracie witaminy C w ilości ok. 200 mg/tydzień, a Bakaev i wsp. – 132,0 ± 13,6 mg/zabieg (4, 116). Biorąc pod uwagę wysokie wartości klirensu, obserwowany spadek stężenia kwasu askorbinowego w osoczu podczas zabiegu hemodializy jest umiarkowany (średnio o 33 %). Należałoby się jednak zastanowić, czy informacje te przekładają się w większości stacji dializ na zalecenia zwiększenia podaży witaminy C w diecie lub uzupełnienia w innej formie?

Dane dotyczące objętości dystrybucji dla kwasu askorbinowego różnią się, lecz wskazują na duże jej wartości dla tej witaminy, co tłumaczy zakres spadku jej stężenia w czasie HD (9, 80). Międzyosobnicza zmienność objętości dystrybucji oraz obecność zmagazynowanych rezerw kwasu askorbinowego w ustroju przyczyniają się również do

zróżnicowanej odpowiedzi poszczególnych chorych na dializę (168). Średnie stężenia witaminy C oraz procentową zmianę przed i po hemodializie w zależności od pór roku u badanych w tej pracy chorych przedstawiono na ryc. 1.

W badaniu przeprowadzonym przez Morenę i wsp., dotyczącym konwekcyjnej i dyfuzyjnej utraty witaminy C podczas hemodiafiltracji (HDF) w odpowiedzi na stres oksydacyjny, obserwowano znamienne obniżenie się stężenia witaminy C w osoczu po zabiegu. Zabieg HDF wiązał się z istotnym obniżeniem stężeń witaminy C (1,87 ± 1,57 μg/ml przed HDF i 0,98 ± 0,68 μg/ml po HDF) (116). W praktyce oznacza to ryzyko eliminacji większych ilości witaminy C z organizmu chorych na drodze klirensu konwekcyjnego.

W przeprowadzonych badaniach własnych wykazano spadek stężenia witaminy C po HD wynoszący od 38,94 % do 69,45 %. Wstępnie wysunięto tezę, że im dłużej trwa okres leczenia pacjenta hemodializą, tym niższe powinno być średnie stężenie witaminy C w surowicy. Tezy tej nie potwierdzono, gdyż nie stwierdzono znamiennych statystycznie różnic w stężeniach witaminy C w kolejnych badaniach u chorych dializowanych powyżej i poniżej 2 lat (tab. XVII).

Kolejne robocze hipotezy w trakcie realizowania badań obecnej pracy zakładały, że stężenia witaminy C powinny być tym niższe im większa będzie ultrafiltracja podczas HD, im wyższy będzie wskaźnik dializy Kt/V (> 1,2) i im wyższe będzie przeddializacyjne stężenie kreatyniny podczas kolejnych badań. Po analizie uzyskanych wyników nie stwierdzono znamiennej statystycznie korelacji pomiędzy spadkiem stężenia witaminy C podczas hemodializy a powyższymi parametrami. Nie potwierdzono istnienia korelacji pomiędzy przeddializacyjnym stężeniem iPTH, albuminy, ferrytyny, stopniem wysycenia transferyny żelazem a stężeniem witaminy C w surowicy osób hemodializowanych (tabele XVIII – XXVI).

Rocco i Machoff w 1997 roku, ocenili podaż witaminy C w populacji pacjentów hemodializowanych z południowo-wschodnich obszarów Stanów Zjednoczonych, która wynosiła 53,5 ± 26,1 mg/dobę (zakres 14,6 ± 125,4 mg/dobę). Średnia utrata witaminy C w trakcie pojedynczej sesji dializacyjnej wynosiła 125 mg (133). Populacja chorych hemodializowanych poddana badaniu w niniejszej pracy spożywała więcej witaminy C. Na podstawie przeprowadzonych ankiet żywieniowych ustalono, że spożycie wynosiło średnio od 69,3 do 86,9 mg/dobę. Suplementacja witaminy C w ilości 60 mg/dobę może okazać się niewystarczająca u pacjentów z niską podażą witaminy C w diecie oraz przy jej typowej utracie podczas dializy. Natomiast dawka 200 mg/dobę może prowadzić do wzrostu stężenia witaminy C w surowicy i do wzrostu ryzyka wystąpienia podwyższonego stężenia szczawianów - a w konsekwencji – do oksalozy (62, 87, 133, 145, 165). Trzykrotny wzrost

stężeń szczawianów w surowicy obserwuję się w sytuacji, gdy podaż witaminy C wynosi 500 do 1000 mg/dobę (133, 144). W niniejszym badaniu podaż witaminy C w pożywieniu była powyżej zalecanych norm, co jednak nie zabezpieczało prawidłowego stężenia witaminy C w surowicy w grupie pacjentów hemodializowanych. W grupie tej nie stwierdzono spożycia powyżej 86,9 mg/dobę, a tym samym nie doprowadzono do podwyższenia stężenia szczawianów w surowicy. Powyższe dane odnoszą się również do drugiego roku badania, kiedy suplementowano witaminę C dożylnie (dawka 200 mg witaminy C i.v., po HD, 3 x w tygodniu) a średnia, dzienna dawka witaminy C wynosiła nadal poniżej 100 mg. Podczas innych badań nad suplementacją witaminy C u pacjentów hemodializowanych w ilości 50 do 100 mg/dobę wykazano niewielki wzrost lub brak wzrostu stężenia szczawianów w osoczu. Były one jednak znamiennie wyższe od obserwowanych u zdrowych uczestników badania, z prawidłową czynnością nerek (133, 144, 145). W prowadzonym badaniu nie oznaczano stężenia szczawianów w surowicy w okresie suplementacji, ponieważ przy takiej małej dawce zagrożenie wzrostem stężenia szczawianów było minimalne.

Wysokie stężenia szczawianów mogą prowadzić do przyśpieszenia procesu uszkodzenia nerek u chorych w okresie przeddializacyjnym, zwiększać ryzyko wystąpienia zawału mięśnia sercowego, uszkodzenia przetoki tętniczo-żylnej, osłabienia mięśni i pojawienia się choroby kości przez odkładanie się kryształów szczawianów w tkankach (69, 107, 110, 112, 133, 144, 145, 168). W badaniu przeprowadzonym przez Descombes'a i wsp. dotyczącym stężeń witamin rozpuszczalnych w wodzie u pacjentów poddawanych hemodializie typu *high-flux*, stwierdzono stężenia szczawianów porównywalne, a nawet niższe niż u pacjentów hemodializowanych nieotrzymujących dodatkowej suplementacji (41). We wspomnianym badaniu pacjenci dodatkowo otrzymywali witaminę C doustnie w dawce 500 mg po każdym zabiegu hemodializy, 3 razy w tygodniu. Można więc wysunąć wniosek, że dodatkowa, adekwatna podaż witaminy C nie nasila wtórnej oksalozy (41, 59). Marangella stwierdził, że podczas hemodializy dochodzi do redukcji stężenia szczawianów o 60 % oraz, że współczesne procedury hemodializy mogą przyczyniać się do zapobiegania akumulacji szczawianów w organizmie, ponieważ ich usuwanie podczas typu *high-flux* hemodializy jest podobne do wydalania szczawianów u osób zdrowych (111).

W Polsce nie przeprowadzano reprezentatywnych, ujednoliconych badań nad spożyciem witaminy C obejmujących większe grupy populacyjne (10). Z różnorodnych danych zawartych w publikacjach wynika, że dzienne spożycie kwasu askorbinowego przez młodzież wynosiło około 49 mg, przez dorosłych mężczyzn – 45 do 55 mg – a przez kobiety – około 35 mg (16). Są to wartości całkowicie nieodpowiadające wynikom niniejszego badania,

w którym dzienne spożycie witaminy C wynosiło od 92,8 do 155,9 mg. Cytowane powyżej polskie piśmiennictwo pochodzi z wczesnych lat 90-tych ubiegłego stulecia. Można przyjąć hipotezę, że w okresie gromadzenia danych do podobnych publikacji, dieta polska była uboższa w witaminy w stosunku do obecnego okresu. W badaniu przeprowadzonym przez Smorczewską-Czupryńską i wsp. w roku 2003 (148), oceniono zawartość witamin antyoksydacyjnych w poszczególnych porach roku w diecie młodzieży gimnazjalnej zamieszkałej w rejonie Białegostoku. Ocenę sposobu żywienia przeprowadzono metodą wywiadu żywieniowego z ostatnich 24 godzin przed badaniem wg zaleceń Instytutu Żywienia i Żywności w Warszawie. Zawartość witamin A i E w diecie młodzieży w badanych porach roku znacznie przekraczała zalecane normy. Najprawdopodobniej miało to związek z wyższym od zalecanego spożyciem tłuszczów przez badane osoby. Zawartość witaminy C w analizowanych jadłospisach także przekraczała zalecaną normę. W dietach dziewcząt w sezonie wiosennym norma ta była przekroczona dwukrotnie. Badane dziewczęta charakteryzowały się niską masą ciała, a ich głównym posiłkiem był przeważnie obiad, w skład którego wchodziły duże ilości jarzyn (148). Jednak nie oznaczono stężenia wymienionych witamin w surowicy badanych i nie można było stwierdzić, jak u ocenianych osób ma się ilość spożytych w pokarmie witamin w stosunku do poziomu witaminy E i C w surowicy krwi.

Badania ostatnich lat, m.in. *The Second National Health and Nutrition Survey* – NHANES II, badania Lykkesfeldtin i wsp. oraz Steinberg i wsp., przeprowadzone u mężczyzn palących papierosy wykazały, że ich dzienne zapotrzebowanie na witaminę C było wyższe o około 40 % w stosunku do zdrowej populacji jak również, że jest ona głównym czynnikiem antyoksydacyjnym, którego stężenie ulega zmniejszeniu u palących papierosy (98, 99, 150). Całkowite stężenie witaminy C w osoczu osób palących może ulec normalizacji w wyniku umiarkowanej suplementacji tą witaminą, tj. około 140 mg/dobę (99, 150). Dym papierosowy zawiera wiele reaktywnych związków tlenowych. Dlatego też palacze są poddawani nieustannemu stresowi oksydacyjnemu (115, 150). Ekspozycja na dym papierosowy prowadzi do nasilenia oksydatywnego uszkodzenia DNA oraz do wzmożenia peroksydacji lipidów, czego odzwierciedleniem jest wzrost stężenia krążących F2-izoprostanów (produktu ubocznego procesów utleniania kwasu arachidonowego) (18, 150). Wszystkie te procesy prowadzą do zwiększenia wrażliwości LDL na reakcje oksydacyjne i do przyśpieszenia powstawania miażdżycy u palaczy tytoniu (1, 99, 142, 150).

Kolejnym, istotnym czynnikiem inicjującym aterogenezę jest adhezja leukocytów do endotelium. Palacze tytoniu posiadają niższe stężenie witaminy C w surowicy w porównaniu

do niepalących, a monocyty izolowane od osób palących wykazują zwiększoną adhezję do komórek endotelialnych. Weber i wsp. (18) suplementowali witaminę C palaczom w dawce 2000 mg/d przez 10 dni, powodując zwiększenie jej stężenia w osoczu z 48 do 83 µmol/l, zmniejszając równocześnie w znacznym stopniu adhezję monocytów do komórek endotelialnych. Badania *in vitro* wykazały, że fizjologiczne stężenia witaminy C mogą spowodować zwiększenie produkcji prostaglandyn (PGE_1 i PGI_2), co w efekcie prowadzi do zmniejszenia agregacji krwinek płytkowych i obniżenia tendencji do tworzenia się skrzeplin. Hamowanie biosyntezy prostacykliny PGI_2 oraz blokowanie uwalniania NO ze śródbłonka naczyń powoduje powstanie stresu oksydacyjnego, co stanowi jeden z elementów rozwoju miażdżycy. W hamowaniu biosyntezy prostacykliny PGI_2 biorą udział rodniki hydroksylowe $OH^{\cdot}$, które są selektywnymi inhibitorami syntezy prostacykliny. Rodniki $O_2^{-\cdot}$ unieczynniają NO z wytworzeniem wysoce toksycznego i nietrwałego związku nadtlenoazotynu ONOOH będącego źródłem $OH^{\cdot}$ (18, 22, 29, 173).

W niniejszej pracy, opierając się na powyższych doniesieniach, badano stężenia witaminy C w obrębie grupy chorych dializowanych oraz grupy kontrolnej. W wynikach przedstawionych tabelach XI, XII, XIII nie stwierdzono znamiennych statystycznie różnic w stężeniach witaminy C pomiędzy niepalącymi i palącymi w badanych grupach. Są to wyniki, które nie potwierdzają rezultatów innych badaczy nad kwestią korelacji palenia tytoniu i stężenia witaminy C, zakładając, że mocznica *„per se"* nie wywiera tu dodatkowego, niekorzystnego wpływu.

Jednoznacznie wykazano istnienie różnicy w zapotrzebowaniu na witaminę C u kobiet i u mężczyzn. Przy jednakowym spożyciu witaminy C, jej stężenie w surowicy było niższe u mężczyzn niż u kobiet. Aby uzyskać to samo stężenie witaminy C w surowicy mężczyźni musieli spożywać trzykrotnie większe jej ilości (16).

W przeprowadzonych, własnych badaniach nie potwierdzono powyższych tez. Nie stwierdzono znamiennych statystycznie różnic w stężeniach witaminy C pomiędzy mężczyznami i kobietami w obrębie badanych grup (p. tabele XIV, XV i XVI).

W tabeli X przedstawiono stężenia witaminy C w kolejnych badaniach w grupie kontrolnej (początek obserwacji – jesień; 3 mies. obserwacji – zima; 6 mies. obserwacji – wiosna, 9 mies. obserwacji – lato; 12 mies. obserwacji - jesień). Wiemy, że prawidłowe stężenie kwasu askorbinowego w osoczu krwi człowieka powinno wynosić 54 – 76 µmol/l (123), a zalecane w podręczniku *Normy Żywienia Człowieka* 49,97 – 60,19 µmol/l (16). W przeprowadzonych badaniach będących przedmiotem niniejszej pracy, najwyższe średnie stężenia stwierdzono w jesieni 81,91 µmol/l, a najniższe na wiosnę 39,44 µmol/l. Odnosząc

się do cytowanych norm, w okresie wiosennym badana populacja kontrolna miała stężenia witaminy C w surowicy poniżej normy. W sezonach jesiennych stężenia witaminy C sięgały powyżej zalecanej normy (odpowiednio: 81,9 μmol/l i 82,95 μmol/l), a pozostałe wyniki tj. w zimie i w lecie (odpowiednio: 55,94 i 65,69 μmol/l) mieściły się w granicach zalecanych norm. Na rycinie 3, w teście ANOVA Friedmana, stwierdzono istotne statycznie różnice ($p < 0,00001$) pomiędzy stężeniami witaminy C w grupie kontrolnej w okresie rocznej obserwacji. Można stwierdzić, występowanie sezonowości zmian stężeń witaminy C w surowicy w grupie kontrolnej, z najniższą medianą średniej wartości stężeń w 6 miesiącu badania (na wiosnę), a najwyższą na jego początku (w jesieni) i porównywalnym stężeniem po 12-miesięcznej obserwacji (ponownie w jesieni). Analizując ankiety żywieniowe (tabela XXVII) w badanych okresach, największe spożycie witaminy C w grupie kontrolnej występowało w lecie i wynosiło 155,9 mg/dobę (jako średnia z 7-miu dni). Największe spożycie potasu w wymienionej grupie występowało również w lecie i wynosiło 1303,4 mg/dobę (jako średnia z 7-miu dni), co przedstawiono w tabeli XXVII. Można przypuszczać, że w wyniku zwiększonego spożycia witaminy C i akumulacji w okresie letnim doszło do ponadnormatywnego podwyższenia stężenia witaminy C w surowicy w okresie jesiennym. Natomiast najniższe spożycie witaminy C w grupy kontrolnej występowało w jesieni – 92,8 mg/dobę i w zimie – 95,8 mg/dobę (jako średnia z 7-miu dni). Można ponownie przypuszczać, że w wyniku zmniejszonego spożycia witaminy C i braku jej akumulacji w ustroju w okresie jesienno-zimowym doszło do stopniowego obniżenia stężenia witaminy C w surowicy w okresie zimowym i spadku stężenia poniżej normy w okresie wiosennym. Przez cały rok zawartość spożytej witaminy C w tej populacji była zgodna z zalecanymi normami RDA – 60 mg/24 h (12, 15, 25, 57, 71, 73, 90, 97, 99, 123, 131, 150, 159, 174). W okresie jesienno-zimowym ilość witaminy C w diecie grupy kontrolnej (wg przeprowadzonych ankiet żywieniowych) zabezpieczała dzienne zapotrzebowanie na witaminę C. Obserwacje poczynione w niniejszej pracy potwierdzają natomiast istniejącą tendencję do wzrostu RDA do wartości 100 – 120 mg/dobę dla zdrowych niepalących osób, prowadząc do normalizacji stężeń w okresie wiosennym, a więc - całorocznej stabilizacji stężenia witaminy C w surowicy (18).

Stężenia witaminy C w populacji chorych dializowanych w kolejnych badaniach – na początku obserwacji (jesień), oraz po 3 (zima), 6 (wiosna), 9 (lato) i 12 miesiącach (jesień) obserwacji – przedstawiono w tabeli IX oraz na rycinie 2. Obserwując medianę wartości stężeń (nie biorąc pod uwagę dwunastego miesiąca badania – jesień), stężenia witaminy C w surowicy we wszystkich porach roku były poniżej zalecanej normy (odpowiednio: 11,79;

12,34; 6,78; 45,46 μmol/l), tak jak stwierdzili Ha i wsp. (64), Wang i wsp. (168) oraz Bohm i wsp. (11). Najniższą medianą stężeń stwierdzono w 6-tym miesiącu badania – na wiosnę (6,78 μmol/l) a najwyższą medianą – w lecie (45,46 μmol/l) oraz po 12-miesięcznej obserwacji – ponownie w jesieni (83,23 μmol/l). Wartość 83,23 μmol/l jest stężeniem witaminy C w surowicy przekraczającą zalecaną normę dla tej witaminy. Wynik ten jest nieoczekiwany i niewiarygodny w stosunku do oznaczonych w poprzednich okresach stężeń. W odniesieniu do ryciny 8, gdzie przedstawiono różnice w stężeniach witaminy C pomiędzy chorymi dializowanymi a grupą kontrolną po 12 miesiącach badania, jedynie w tym okresie stężenia witaminy C w populacji chorych dializowanych były wyższe od grupy kontrolnej i nie różniły się istotnie statystycznie ($p< 0,001$). Na rycinach 4, 5, 6 i 7, w teście Manna-Whiney'a porównując stężenia wykazano znamienne statycznie różnice ($p < 0,05$) w stężeniach witaminy C pomiędzy chorymi dializowanymi a grupą kontrolną w okresie jednorocznej obserwacji, stwierdzając znacznie niższe wartości stężeń witaminy C (poniżej zalecanej normy dla tej witaminy) w populacji chorych dializowanych. Przyczynę wzrostu stężenia witaminy C u pacjentów hemodializowanych w dwunastym miesiącu badania można wytłumaczyć tym, że w dziewiątym miesiącu (na końcu lata) przedstawiono tej grupie częściowe wyniki stężeń tej witaminy. Można podejrzewać, iż informując o istniejącym niedoborze w poprzednich okresach, pacjenci zaczęli przyjmować tę witaminę bez wiedzy lekarza prowadzącego, pomimo jednoznacznie brzmiącej prośby o powstrzymywaniu się od dodatkowej suplementacji witaminy C (np. w postaci drażetek lub innych witaminizowanych preparatów). W tym okresie nie prowadzono już ankiet żywieniowych, nie można było więc porównać ilości spożytej witaminy C w dwóch okresach jesiennych na przestrzeni roku. Hipotezę te przedstawiono na rycinie 2, gdzie stężenie witaminy C w dwunastym miesiącu (jesień) w grupie chorych dializowanych nieoczekiwanie wzrosło. Nie obserwowano różnic w stężeniach witaminy C w grupie kontrolnej pomiędzy początkiem oznaczania stężenia tej witaminy (jesień) a dwunastym miesiącem badania (ponownie okres jesienny), co przedstawiono na rycinie 3.

Badając i analizując różnice w średniej ilości spożycia witaminy C pomiędzy chorymi dializowanymi a grupą kontrolną (ryc. 9) wykazano wyższe spożycie tej witaminy przez grupę kontrolną wyłącznie w okresie letnim (kwartał II). W pozostałych porach roku nie stwierdzano znamiennych statystycznie różnic spożycia witaminy C w obu grupach, pomimo oczekiwań mniejszego spożycia tej witaminy w grupie chorych hemodializowanych z powodu ograniczeń dietetycznych. W trakcie analizy ankiet żywieniowych (tabela XXVII) największe spożycie witaminy C w grupie chorych hemodializowanych stwierdzono na

wiosnę. Wynosiło ono 86,9 mg (jako średnia z 7 dni). W tym okresie oznaczone średnie stężenie witaminy C w surowicy chorych wynosiło 6,78 μmol/l (i było to najniższe stężenie odnotowane w całym badaniu). Z uwagi na najwyższe spożycie witaminy C wśród grupy hemodializowanych w okresie wiosennym jest to również wynik nieoczekiwany. Spodziewano się największego spożycia witaminy C w lecie lub w jesieni, a to z powodu większej dostępności owoców i warzyw, jaka jest w tym okresie i ich stosunkowo niskiej ceny. Trzeba jednak pamiętać, że znaczącą rolę w pokrywaniu zapotrzebowania na witaminę C w Polsce pełnią ziemniaki, w szczególności w grupie chorych hemodializowanych (jako nawyk żywieniowy w zalecanej uprzednio diecie z okresu przeddializacyjnego). Wiosną spożywamy młode ziemniaki, w których zawartość witaminy C jest największa. Ziemniaki przechowywane w temperaturze pokojowej tracą miesięcznie 15 % wyjściowej zawartości witaminy C (16). Trzeba zasygnalizować, że w tym okresie nie stwierdzono znamiennych statystycznie różnic w spożyciu witaminy C pomiędzy chorymi hemodializowanymi a grupą kontrolną.

Podaż witaminy C w pokarmach w okresie wiosennym nie była wystarczająca dla obu grup. Najniższe stężenia tej witaminy w surowicy w grupie kontrolnej stwierdzono na wiosnę (39,44 μmol/l) (tab. X, ryc. 3). Jest to jedyna wartość stężenia dla tej grupy w całym okresie badania, będąca poniżej zalecanej normy przy spożyciu witaminy C zgodnie z zalecaną dawką, przyjmując za normę zalecenia RDA. W grupie chorych hemodializowanych stężenie witaminy C w surowicy było niskie w okresie wiosennym (6,78 μmol/l) (tab. IX, ryc. 2). Na podstawie przeprowadzonych analiz można przypuszczać, że spożycie witaminy C i akumulacja w okresie wiosennym doprowadziły do stopniowego narastania jej stężenia oraz pojawienia się najwyższych wartości stężeń w grupie hemodializowanych w okresie letnim (45,46 μmol/l) (tab. IX, Ryc. 2). Nadal było to jednak stężenie poniżej zalecanej normy (16, 123).

Najniższe spożycie witaminy C w grupie chorych dializowanych występowało w okresie zimowym – 69,3 mg i letnim – 69,3 mg (jako średnia z 7-miu dni) (tab. XXVII). Odpowiadające spożyciu stężenie witaminy C w surowicy wynosiło 12,34 μmol/l w zimie, a w lecie – 45,46 μmol/l (tab. IX, Ryc. 2). Można ponownie przypuszczać, że niskie spożycie witaminy C i brak możliwości akumulacji witaminy w okresie zimowym z powodu relatywnie niskich stężeń (stężenie witaminy C w jesieni wynosiło 11,79 μmol/l – porównywalne do stężenia w zimie) spowodowały pojawienie się najniższego stężenia witaminy C w grupie hemodializowanych w kolejnym okresie (wiosennym) – 6,78 μmol/l. Zaistniało jednocześnie podejrzenie, że chorzy hemodializowani w późnym okresie letnim, po poinformowaniu ich o istniejących niedoborach, zaczęli niezależnie przyjmować witaminę C. Stężenie witaminy C w

surowicy w tym okresie wynosiło 45,46 μmol/l. Potwierdzeniem powyższej tezy jest wynik stężenia witaminy C w kolejnym okresie (jesiennym) wynoszący 83,23 μmol/l. Spożycie witaminy C oraz jej akumulacja w ustroju w okresie letnim spowodowały pojawienie się nieoczekiwanego, niewiarygodnego, wysokiego stężenia witaminy C w surowicy krwi tych chorych w okresie jesiennym, w 12 miesięcy po rozpoczęciu badania. Było to najwyższe, obserwowane stężenie witaminy C w grupie hemodializowanych w całym badaniu, w jego I i II etapie. Co ciekawe, jedynie w tym okresie stężenia witaminy C znajdowały się w zakresie zalecanej normy, a nie poniżej normy (16, 123). Stężenia witaminy C w grupie chorych hemodializowanych i kontrolnej w 12 miesiącu badania (w jesieni) były porównywalne.

Najniższe średnie spożycie witaminy C w grupie kontrolnej występowało w jesieni i wynosiło średnio 92 mg/dobę (tab. XXVII). Odpowiadające spożyciu stężenie witaminy C w surowicy w okresie jesiennym wynosiło 81,91 μmol/l (tabela X). W okresie zimowym stężenie witaminy C w surowicy w grupie kontrolnej obniżyło się do 55,54 μmol/l. Można przypuszczać, że spożycie witaminy C (najniższe dla tej grupy w całym badanym okresie) i brak akumulacji w okresie jesiennym spowodowały pojawienie się stopniowego spadku stężenia witaminy C w surowicy w okresie zimowym również dla grupy kontrolnej (ryc. 3).

Według przeprowadzonych ankiet żywieniowych spożycie witaminy C w badanej grupie chorych hemodializowanych było prawidłowe w stosunku do zalecanej dawki wynoszącej 60 mg/24 h (tabela XXXIII w Aneksie) (48, 62, 108, 133, 144, 145). Nie jest to jednak wystarczająca dawka dla chorych z niedoborem witaminy C w surowicy, ponieważ przy zaistnieniu niedoboru niezabezpieczone są prawidłowe stężenia witaminy C w surowicy chorych hemodializowanych. W tej sytuacji zalecana dawka witaminy C musi wynosić 100 mg/dobę, aż do uzyskania normalizacji stężenia w surowicy (tabela V) (48, 62, 108, 133, 144, 145). Wyniki niniejszej pracy wskazują, że średnie spożycie witaminy C w grupie chorych hemodializowanych nie przekraczało 86,9 mg/dobę, co mogło być jedną z przyczyn prowadzących do znacznego jej niedoboru.

Zapasy ustrojowe witaminy C wynoszą (według różnych autorów) od 1,5 g do 3,0 g. Okres półtrwania w zależności od wielkości spożycia wynosi od 20 do 56 dni (16). Gdy nie będziemy dostarczać ustrojowi zalecanej dawki witaminy C w pożywieniu (60 mg/dobę) lub gdy nie będziemy jej suplementować w okresach niedoboru – jako dodatek witaminowy – to stężenie w surowicy będzie spadało poniżej normy po maksymalnym okresie wynoszącym około 3-ch miesięcy. Jeśli zapasy tej witaminy spadną poniżej 300 mg, pojawiają się kliniczne objawy niedoboru witaminy C (p. tabele Ia oraz Ib) (100, 113). Ustalono, że spożycie 10 – 12 mg witaminy C dziennie lub jej stężenie w surowicy < 11 μmol/l powoduje osłabienie struktur

kolagenu oraz mnogie wybroczyny krwawe naczyń włosowatych. Dotychczas obowiązujące kryteria niedoboru witaminy C według Interdepartmental Committee on Nutrition for National Defense (Międzywydziałowy Komitet Obrony Cywilnej do Spraw Żywienia; ICNND) z roku 1963 oparte były wyłącznie na kryteriach klinicznych, tzn. objawach szkorbutu (75). Według tych kryteriów stężenia wynoszące < 11,36 μmol/l przyjęto jako szkorbutogenne, stężenia > 22,7 μmol/l – jako prawidłowe. Bessy i Lowry przyjęli stężenie < 22,7 μmol/l jako niskie, stężenia w granicach 22,7 – 34,1 μmol/l – jako niedoborowe, a stężenia > 34,1 μmol/l – jako prawidłowe (8). W odniesieniu do powyższych kryteriów, populacja chorych hemodializowanych wykazywała prawidłowe stężenia witaminy C w surowicy jedynie w okresie dziewiątego miesiąca prowadzonego badania (lato), natomiast na początku badania (jesień), w trzecim miesiącu (zima) oraz w szóstym miesiącu (wiosna) stwierdzano poziomy niedoborowe, szkorbutogenne (zgodnie z ICNND (75) i zgodnie z obserwacjami Bessy i Lowry (8)). Grupa kontrolna, będąca przedmiotem analizy w niniejszej pracy, utrzymywała stężenia witaminy C w zakresie prawidłowym przez cały okres badania, nie będąc zagrożona wystąpieniem objawów szkorbutu.

W drugim roku badania (etap II – wiosna/maj) zakwalifikowano 68 chorych do suplementacji witaminy C (3 x w tygodniu, w dawce 200 mg dożylnie, przez 8 tygodni). Badano stężenia tej witaminy bezpośrednio przed rozpoczęciem cyklu podaży, po zakończeniu 8 tygodniowego okresu suplementacji i po 2 miesiącach od zakończenia cyklu suplementacji. Decyzję o rozpoczęciu suplementacji w powyższym terminie podjęto na podstawie obserwacji stężenia witaminy C, które było najniższe w grupie chorych hemodializowanych w okresie wiosennym roku poprzedniego. Analizowano wzrost stężenia witaminy C oraz wartości stężeń tej witaminy w stosunku do zakresów referencyjnych. Na początku badania, tak jak w roku poprzednim (ryc. 2), badając stężenia witaminy C w grupie chorych hemodializowanych stwierdzono wartości mediany stężeń witaminy C poniżej 20 μmol/l (ryc. 12). Analizując wzrost stężenia witaminy C bezpośrednio po zakończeniu okresu suplementacji, wykazano medianę stężenia witaminy C w zakresie około 40 μmol/l (ryc. 12). W odniesieniu do wymienionych kryteriów, populacja chorych hemodializowanych wykazywała w tym okresie prawidłowe stężenia witaminy C w surowicy. Konfrontując otrzymane wyniki z normami zalecanymi w podręczniku *Normy Żywienia Człowieka* (49,97 – 60,19 μmol/l) (16) oraz z innymi, gdzie prawidłowe stężenie kwasu askorbinowego w osoczu krwi człowieka wynosiło 54 – 76 μmol/l (123), wartość mediany stężeń witaminy C po okresie suplementacji była nadal niedoborowa.

Na ryc. 13 i 14 przedstawiono wzrost (znamienny statystycznie, $p < 0{,}00002$) stężenia witaminy C w badanej populacji po okresie suplementacji. W dwa miesiące po zakończeniu suplementacji jej stężenie powróciło do wartości zbliżonych do wyjściowych (p - NS). Porównując wartości stężeń witaminy C w okresie dwóch miesięcy po zakończeniu suplementacji (ryc. 14) i odpowiadające im stężenia witaminy C sprzed roku (ryc. 2), można zaobserwować, że oba okresy charakteryzują się porównywalnymi wartościami (poniżej 20 μmol/l).

W wynikach badań nad stężeniem witaminy C (nie przedstawionych w niniejszej pracy) nad zachowaniem się stężenia witaminy C przed HD, po HD i po 48 godz. po HD wykazano, że średnie stężenia witaminy C bezpośrednio po przeprowadzonej HD spadają o 45 % lecz stężenie witaminy C po 48 godz. od HD powraca do porównywalnych wartości stwierdzanych przed HD. Dowodzi to istnienia zapasów witaminy C w organizmie, ale zapasów wystarczających jedynie na 20 do 56 dni (16). Podczas braku suplementacji witaminy C w dawkach utrzymujących stężenie w surowicy w granicach normy, stężenie witaminy C będzie stopniowo opadało do wartości niedoborowych, jak przedstawiono na rycinach 12, 13 i 14.

Potwierdza to tezę o istnieniu jednoznacznych wskazań do suplementacji witaminy C w każdym okresie, w którym jej stężenie w surowicy jest poniżej zalecanej normy. W trakcie podaży zaleca się monitorowanie jej stężenia, a wynika to z faktu braku przekonywujących danych nt. suplementacji u chorych hemodializowanych z jej niedoborem oraz zachowania się stężeń witaminy C w surowicy. Odrębnym problemem, wymagającym w przyszłości ukierunkowanych badań, jest zagadnienie kinetyki witaminy C w czasie cyklu dializacyjnego oraz próby wymodelowania zachowania się stężeń. Może się okazać, że dopiero wyliczenie współczynników modelu, takich jak KoA dializatorów dla witaminy C lub Kc – klirensu komórkowego tej witaminy, lub jej „*rebound*" – odbicie – dadzą wgląd w wewnątrzustrojowe przesunięcia witaminy C oraz kompartmentowość jej dystrybucji.

W tabeli XXIX zainicjowano próbę znalezienia korelacji pomiędzy wzrostem stężenia witaminy C po suplementacji a parametrami: średnim stężeniem iPTH, stężeniem glinu i średnią wartością Kt/V, w grupie chorych dializowanych. Nie stwierdzono znamiennej statycznie korelacji pomiędzy wzrostem stężenia witaminy C po suplementacji a powyższymi parametrami w badanym okresie. Stwierdzono natomiast znamienną, statystycznie ujemną korelację pomiędzy przyrostem stężenia witaminy C a stopniem wydializowania kreatyniny, którą przedstawiono na ryc. 15. Jak wspomniano, na podstawie danych z piśmiennictwa, wyliczony klirens dializatora dla kwasu askorbinowego był wysoki (w zakresie 190 – 272

ml/min., przy średniej wartości przepływu krwi 288 ml/min. oraz przepływie dializatu 500 ml/min.) (152, 168). Wartość klirensu witaminy C pokrywa się z danymi dotyczącymi wartości klirensu kreatyniny i mocznika, które zostały określone dla dializatora *in vitro* przez Rocco i wsp., co potwierdza znamienną, ujemną korelację przedstawioną powyżej (133). W praktyce jednak klirensy rzędu 190 ml/min. uzyskuje się w dializatorach średniej klasy przy przepływach krwi rzędu 250 ml/min. Klirensy rzędu ± 270 ml/min. i wyżej zapewniają tylko filtry o KoA ± 1000 ml/min., przy przepływach krwi ok. 300 ml/min. Informacje te rodzą pewne wątpliwości. Wysoce sztuczna dializa typu *high-flux* może bez problemu usuwać pokaźne ilości witaminy C.

Problemem, który powstał w trakcie suplementacji witaminy C przez okres 8 tygodni u badanych przeze mnie chorych, było pojawienie się infekcji. W niniejszym badaniu, zgodnie z przyjętymi założeniami, zaistniała potrzeba podaży antybiotyku p.o. lub i.v. z powodu pojawienia się objawów infekcji, takich jak wzrostu temperatury powyżej 38,0 ˚C, kaszlu, ze zmianami w kontrolnym badaniu RTG płuc lub innych zmian - wskazujących na obecność aktywnego stanu zapalnego. W okresie suplementacji nie stwierdzono wpływu infekcji na stopień wzrostu stężenia witaminy C (p - NS), co przedstawiono w tabeli XXX. Można przypuszczać, że pojawienie się zwiększonego zagrożenia stresu oksydacyjnego i tym samym wzrost produkcji wolnych rodników spowodował, iż dostępna, suplementowana witamina C w surowicy została utleniona w procesach bariery antyoksydacyjnej. Nie doszło do naruszenia zapasów witaminy C w ustroju, a dalsza podaż witaminy C i.v. była adekwatna dla udostępnienia substratów antyoksydacyjnych i zapewnienia utrzymania stężenia tej witaminy w surowicy na stabilnym poziomie, pozostającym bez wpływu na obserwowany wzrost stężenia witaminy C.

Gospodarkę żelazem oraz hemopoezę wraz ze zużyciem rHuEPO oceniono w okresie przed suplementacją witaminy C, bezpośrednio po jej zakończeniu, oraz po 2 i 4 miesiącach od zakończenia suplementacji. Podobne parametry określono jednocześnie u pacjentów dializowanych z wtórną nadczynnością przytarczyc (stężenie iPTH > 800 pg/ml) i u chorych z toksycznym stężeniem glinu (Al) w surowicy (stężenie Al > 50 µg/l), które to przyczyny mogły spowodować oporność na podawaną erytropoetynę. Na ryc. 16 przestawiono dawkowanie rHuEPO przed suplementacją, podczas suplementacji oraz w 2 i 4 miesiącu po zakończeniu suplementacji witaminy C. Stwierdzono istotne statystycznie różnice ($p < 0,00001$) w dawkowaniu erytropoetyny w tym okresie. Mediana tygodniowej dawki rHuEPO na początku oraz w trakcie suplementacji wynosiła około 3000 j./tydzień. Po 2 i 4 miesiącach od zakończenia podaży witaminy C mediana dawki rHuEPO obniżyła się do 2000 j/tydzień i

utrzymywała się na jednakowym poziomie przez cztery miesiące po zakończeniu suplementacji. Wyniki korelujące z odnotowanym spadkiem mediany dawki rHuEPO w okresie 2 i 4 miesiące po zakończeniu suplementacji znajdują się na rycinie 17 i 18. Przedstawiono na nich wartości hematokrytu oraz stężenie hemoglobiny przed suplementacją witaminy C, bezpośrednio po jej zakończeniu oraz 2 i 4 miesiące później. W teście Anova-Friedmana stwierdzono istotny statystycznie wzrost ($p < 0,00001$) wartości hematokrytu i stężenia hemoglobiny po okresie suplementacji oraz w 2 i 4 miesiące po jej zakończeniu.

Na rycinach 19, 20, 21 przedstawiono istotny statystycznie wzrost ($p < 0,05$) saturacji transferyny i stężenia żelaza w surowicy po okresie suplementacji oraz w 2 i 4 miesiące po jej zakończeniu przy jednocześnie znamiennie ($p < 0,05$) zmniejszonym jej dawkowaniu. Nie stwierdzono istotnego statystycznie wzrostu zmian w wartości MCV w stosunku do uzyskanych na początku badania.

Podobnie, stężenia ferrytyny nie zmieniły się istotnie podczas suplementacji oraz w 2 i 4 miesiące po jej zakończeniu (p-NS). Powyższe wyniki są zgodne z wynikami badań innych autorów nad wpływem podaży witaminy C na dawkowanie rHuEPO u chorych hemodializowanych (33, 36, 39, 58, 60, 70).

Aktualne wytyczne Grupy Roboczej ds. Zaleceń Europejskiej Dobrej Praktyki Klinicznej (EBPG Group) dotyczące postępowania z niedokrwistością u pacjentów z PNN podkreślają ważność oceny niedoboru witaminy C, zwłaszcza po wykluczeniu istnienia znanych przyczyn związanych z niedostateczną odpowiedzią na rHuEPO (34, 38, 40, 155, 178). Witamina C potencjalnie zwiększa jelitowe wchłanianie żelaza i jego mobilizację z inertnych magazynów tkankowych oraz polepsza utylizację żelaza przez komórki erytrocytotwórcze (34, 38, 40, 155, 178). W badaniu prowadzonym przez Hörla i wsp. (70), opisującym rolę terapii wspomagającej w leczeniu rHuEPO przy subklinicznym niedoborze witaminy C u chorych z PNN, zalecano podaż 1 – 1,5 g witaminy C doustnie lub 300 mg kwasu askorbinowego dożylnie, 3 razy w tygodniu, po każdym zabiegu HD. Jednakże dowody na potwierdzenie tychże zaleceń są niewystarczające i nadal nie wiadomo, kiedy należy spodziewać się niedoboru witaminy C.

W pionierskim badaniu Gastaldello i wsp. zanotowano istotne korzyści z 3-miesięcznej terapii witaminą C w dawce 1 g/tydz., dożylnie u siedmiu dializowanych pacjentów z prawidłową gospodarką żelazem (ferrytyna > 100 µg/l, saturacja transferyny > 25 %) i umiarkowanym dawkowaniem rHuEPO (rHuEPO < 100 j./kg/tydz.) (58). Wartość hematokrytu oraz stężenie hemoglobiny uległy poprawie (odpowiednio od 26,5 ± 0,7 do 32,7 ± 0,4 % i od 8,8 ± 0,3 do 10,8 ± 0,2 g/dl) ($p < 0,001$), znacząco wzrosła saturacja transferyny (z 27 ± 7 do 54 ± 12 %) ($p<0,05$),

podczas gdy stężenie ferrytyny w surowicy pozostawało niezmienione u 4 pacjentów przeładowanych żelazem (ferrytyna > 500 µg/l) po trwającej około 3 tygodnie suplementacji witaminy C (58).

W badaniu Der-Chang i wsp. (36), prowadzonym u 12 chorych dializowanych z współistniejącym przeładowaniem żelazem stwierdzono zmniejszenie średniego zapotrzebowania na rHuEPO (około 20 %) z jednoczesnym znamiennym podwyższeniem średniego hematokrytu (z 25,8 ± 0,5 do 30,6 ± 0,6 %) powiązanym ze wzrostem saturacji transferyny (z 27 ± 3 do 48 ± 6 %) i stężenia żelaza w surowicy (z 70 ± 11 do 107 ± 19 µg/dl) ($p< 0,05$) po 8 tygodniach podaży 300 mg witaminy C dożylnie po każdym zabiegu HD. Stężenie ferrytyny w surowicy zmniejszyło się w sposób nieznamienny statystycznie. W grupie otrzymującej parenteralnie żelazo (bez terapii wspomagającej) nie stwierdzono poprawy w zakresie erytropoezy, jak i zmniejszenia się dawki rHuEPO przez okres 12 tygodni (36).

W erze rekombinowanej erytropoetyny, istniejąca u pacjentów dializowanych hiperferrytynemia, po wykluczeniu istnienia stanu zapalnego, choroby wątroby lub choroby nowotworowej, jest zawsze powiązana z wcześniejszymi, wielokrotnymi przetoczeniami preparatów krwiopochodnych lub z przedawkowaniem preparatów żelaza.

W badaniu Tarng i wsp. uzyskali pozytywne wyniki w stosunku do odpowiedzi na witaminę C, gdy saturacja transferyny wynosiła < 25 % a stężenie protoporfiryny cynkowej w erytrocytach wynosiło > 105, co wskazywało na niedostateczne wbudowywanie żelaza do pierścienia hemu. W badaniu tym u 18 pacjentów wykazano znaczącą odpowiedź (w postaci znamiennego wzrostu stężenia hemoglobiny, odsetka retikulocytów, z współistniejącą 24 % redukcją dawki erytropoetyny po 8 tygodniach) na dożylną terapię kwasem askorbinowym. Równolegle doszło do istotnego wzrostu stężenia żelaza w surowicy i saturacji transferyny. Jednakże, w cztery tygodnie po zakończeniu podaży witaminy C, doszło do obniżenia stężenia hemoglobiny z 10,7 ± 0,9 do 9,9 ± 0,7 g/dl, a chorzy wymagali zwiększenia dawki rHuEPO z 75 ± 44 do 94 ± 47 j./kg/tydzień (39). Stężenie witaminy C na początku badania uznano za prawidłowe. Nie obserwowano różnicy między osobami odpowiadającymi na terapię i nie odpowiadającymi i stopniowo dochodziło do jednakowego jej wzrostu w obu grupach podczas suplementacji. Wyjściowy poziom szczawianów był podobny we wszystkich trzech grupach i ulegał umiarkowanemu wzrostowi, bez osiągnięcia znamienności statystycznej ($p > 0,05$), po ośmiu tygodniach podaży kwasu askorbinowego (39).

Prospektywne, randomizowane, krzyżowe badanie przeprowadzone przez Giancaspro i wsp. u 27 dializowanych pacjentów z niedokrwistością (z niedostateczną odpowiedzią na rHuEPO

z powodu czynnościowego niedoboru żelaza) potwierdziło korzystny wpływ witaminy C na komórki erytropoetyczne (60). Poprawa parametrów czerwonokrwinkowych u wszystkich uczestników badania podczas 3-miesięcznej suplementacji witaminy C (500 mg, 3 razy w tygodniu, dożylnie, po HD) powiązana była ze wzrostem stężenia transferyny. Stężenie hemoglobiny i saturacja transferyny zmniejszyły się po zaprzestaniu terapii witaminą C.
Dane te podtrzymują tezę, że dożylnie podana witamina C mobilizuje wcześniej niedostępne żelazo z zapasów tkankowych do transferyny.
W badaniu krzyżowym przeprowadzonym przez Keven i wsp., spośród losowo wybranych dializowanych pacjentów z niedokrwistością, około 2/3 chorych wykazało pozytywną reakcję na sześciomiesięczną terapię witaminą C w dawce 500 mg, dożylnie, 3 razy w tygodniu (86). Autorzy nie uwzględnili jednak wskaźnika wielkości odpowiedzi w okresie trwania badania oraz nie oznaczyli stężenia szczawianów w surowicy.

Na obecnym etapie wiedzy o niedokrwistości i możliwościach jej leczenia, dane o parametrach wskazujących na bezwzględny lub czynnościowy niedobór żelaza (saturacja transferyny, protoporfiryna cynkowa erytrocytów oraz odsetek hipochromicznych erytrocytów) mogą wspomagać podjęcie decyzji o rozpoczęciu terapii witaminą C w odniesieniu do przełamania niedostatecznej odpowiedzi na rHuEPO (14, 52, 104, 137). Niejasnym pozostaje nadal wartość stężeń witaminy C w surowicy, która powinna leżeć u podstawy podjęcia powyższej decyzji. Krótkotrwała, parenteralna terapia witaminą C nie rozwiązuje problemu czynnościowego niedoboru żelaza u pacjentów hemodializowanych z współistniejącym przeładowaniem żelazem. Dożylna podaż kwasu askorbinowego nie tylko ułatwia uwolnienie zmagazynowanego żelaza, lecz także zwiększa jego utylizację przez komórki erytrocytotwórcze.
Obserwacje z powyższych badań oraz wyniki niniejszej pracy zwracają uwagę na potencjalne, pozytywne efekty leczenia wspomagającego podawanym dożylnie kwasem askorbinowym u pacjentów przeładowanych żelazem z towarzyszącą niedokrwistością, wynikającą z niedostatecznej odpowiedzi na erytropoetynę.

Leczenie rHuEPO stanowi skuteczną terapię niedokrwistości u większości pacjentów z SNN. Pozostaje jednak grupa chorych z niewydolnością nerek wykazująca oporność na podawaną rHuEPO.
W niniejszej pracy pacjentów hemodializowanych podzielono dodatkowo na podgrupy: z poziomem iPTH poniżej i powyżej 800 pg/ml oraz pacjentów bez- i z- toksycznym stężeniem glinu (stężenie Al > 50 μg/l) w surowicy.

Oceniano różnice w dawkowaniu rHuEPO niezbędnym do uzyskania wzrostu stężenia hemoglobiny o 1 g/dl w grupach pacjentów z poziomem iPTH poniżej i powyżej 800 pg/ml od rozpoczęcia suplementacji witaminy C do 4 miesięcy po zakończeniu suplementacji (ryc. 22 – 26). Oceniano także zmiany stężenia hemoglobiny po suplementacji witaminą C w stosunku do wartości przed suplementacją pomiędzy podgrupami pacjentów bez- i z- toksycznym stężeniem Al w momencie zakończenia suplementacji, w 2 i 4 miesiące po jej zakończeniu (ryc. 27 – 31). Zmiany stężenia hemoglobiny po suplementacji witaminą C w stosunku do wartości przed suplementacją nie różniły się pomiędzy podgrupami pacjentów bez- i z- ciężką nadczynnością przytarczyc w momencie zakończenia suplementacji (ryc. 22), 2 miesiące (ryc. 23) i 4 miesiące po jej zakończeniu (ryc. 24). Nie stwierdzono znamiennych statystycznie różnic w dawkowaniu rHuEPO potrzebnym do uzyskania wzrostu stężenia hemoglobiny o 1 g/dl w grupach pacjentów z poziomem iPTH poniżej i powyżej 800 pg/ml od rozpoczęcia suplementacji witaminy C do 4 miesięcy po zakończeniu suplementacji. Dawki rHuEPO potrzebne do uzyskania wzrostu stężenia hemoglobiny o 1 g/dl nie różniły się pomiędzy chorymi z wartości iPTH powyżej i poniżej 800 pg/ml we wszystkich miesiącach obserwacji (ryc. 25, 26).

Zmiany stężenia hemoglobiny po suplementacji witaminą C w stosunku do wartości przed suplementacją nie różniły się pomiędzy podgrupami pacjentów bez- i z- toksycznym stężeniem Al w momencie zakończenia suplementacji (ryc. 27) i w 2 miesiące po jej zakończeniu (ryc. 28).

W 4 miesiącu po zakończeniu suplementacji, wzrost stężenia hemoglobiny był statystycznie znamiennie większy ($p < 0,003$) w podgrupie chorych z toksycznym stężeniem Al (ryc. 29). Nie stwierdzono znamiennych statystycznie różnic w dawkowaniu rHuEPO potrzebnym do uzyskania wzrostu stężenia hemoglobiny o 1 g/dl w grupach pacjentów z nietoksycznym i toksycznym stężeniem Al od rozpoczęcia suplementacji witaminy C do 4 miesięcy po zakończeniu suplementacji.

Chorzy z toksycznym stężeniem Al wymagali w stosunku do chorych z nietoksycznym poziomem glinu większych dawek rHuEPO w celu uzyskania wzrostu stężenia hemoglobiny o 1 g/dl we wszystkich miesiącach obserwacji, jednak różnice te nie były znamienne statystycznie.

Oznaczenie poziomu stężenia Al w niniejszej pracy miało na celu monitorowanie obecności czynnika, który może odpowiadać u chorych hemodializowanych za niedokrwistość oporną na podawaną rHuEPO (38, 91, 92, 139). Szczegółowe określenie rodzaju mechanizmu, w którym Al powoduje niedokrwistość pozostaje do dnia dzisiejszego

niewyjaśnione. Dowody pośrednie wynikają z badań przeprowadzonych z udziałem ludzi i zwierząt. Pozwalają domniemywać udział trzech typów reakcji: zmniejszonej syntezy hemu, zmniejszonej syntezy globiny oraz zwiększonej hemolizy. Reakcje te mogą współistnieć lub występować osobno w zależności od drogi, szybkości i stopnia przeładowania glinem (38, 47, 79, 176). Zarówno mikro- jak i makrocytarną niedokrwistość można indukować u zdrowych zwierząt przy udziale różnorodnych metod podaży glinu. I tak, w badaniach przeprowadzonych przez Drüeke i wsp., zwiększona hemoliza pojawia się u zdrowych jak i u mocznicowych szczurów, którym podawano Al dootrzewnowo (47).

Istnieje również możliwość ingerencji glinu w metabolizm żelaza, w przypadkach nadmiaru w ustroju osobników, z prawidłowym metabolizmem żelaza. Glin zawarty w surowicy związany jest z transferyną. Może on powodować niedokrwistość zarówno przez blokowanie specyficznego receptora dla żelaza w transferynie jak i przez zahamowanie dysocjacji żelaza do receptora tkankowego (164). Zmniejszona synteza hemu może wynikać z obu mechanizmów. Glin wpływa również na działanie dwóch enzymów związanych z syntezą hemu: specyficzną dehydratazę kwasu δ-aminolewulinowego i feroksydazę. Zaburza dojrzewanie komórek szeregu erytrocytotwórczego poprzez molekularne oddziaływanie z DNA i skutkiem tego powoduje makrocytozę i megaloblastozę (14, 47). Co więcej, erytropoeza ulega upośledzeniu na różnych poziomach dojrzewania komórki erytroidalnej z uwagi na zaburzenie wewnątrzkomórkowego odkładania się wapnia, poprzez interakcję glinu i kalmoduliny. Kalmodulina odgrywa istotną rolę w regulacji pompy wapniowej błon erytrocyta, a wewnątrzkomórkowy Ca^{++} wydaje się być jednym z najistotniejszych czynników regulujących erytropoezę (127). U zwierząt przeładowanych glinem obserwowano wzrost oporności osmotycznej erytrocytów, który wskazywał na mechanizm zwiększonej wewnątrznaczyniowej hemolizy, z uwagi na zwiększoną sztywność błony komórkowej (47). Drüeke opisuje obecność depozytów glinu wykrytych w makrofagach w kościach hemodializowanych pacjentów z potwierdzonym zatruciem glinem. W swych wczesnych pracach autor ten wykazał, że po dootrzewnowej podaży glinu w dawce 4 mg dziennie, przez okres 4 tygodni u zdrowych szczurów, ewidentne złogi glinu zobrazowane przy pomocy mikroskopu elektronowego dostrzeżono w makrofagach w kościach (47). Makrofagi odgrywają kluczową rolę w przemianach żelaza pochodzącego ze szpiku poprzez wchłanianie starzejących się erytrocytów, gromadzenie w ferrytynie i dostarczanie go erytroblastom pozwalając na budowę hemu. Można sformułować hipotezę, że wysokie obciążenie glinem może zaburzać szpikowy proces obrotu żelazem, lecz wymaga to bardziej szczegółowych badań (164). Obserwacje te odnoszą się do ostatnich doniesień na temat

oporności na rHuEPO u dializowanych pacjentów z współistniejącym zatruciem glinem (38, 46, 47, 118, 156). Pacjenci ci charakteryzowali się występowaniem anemii mikrocytarnej, pomimo prawidłowych zapasów żelaza. Niedokrwistość wywołana glinem jest obecnie częściej normocytarna niż mikrocytarna, za wyjątkiem pacjentów z przypadkami ciężkiego zatrucia. U pacjentów przepełnionych żelazem, terapia desferoksyaminą (DFO) może przełamać hiporeaktywność na rHuEPO wywołaną glinem, co potwierdzają obserwacje monitorowania stężenia glinu w surowicy tych chorych przed- i po- infuzji DFO (27, 31, 46, 118, 156).

W badaniu przeprowadzonym przez Der-Cheng i Huang u 39 dializowanych pacjentów przeładowanych żelazem, którzy nie wykazywali objawów związanych z podwyższonym stężeniem glinu stwierdzono istotną korelację pomiędzy odpowiedzią na terapię rHuEPO a stężeniem glinu w surowicy. Była ona większa u pacjentów z niższym stężeniem glinu w surowicy, wliczając w to stężenie wyjściowe i 44 godziny po infuzji DFO (37). Jednocześnie, u pacjentów ze słabą odpowiedzią, przyrost stężenia glinu w surowicy po podaży DFO (ΔAl) jest istotnie podwyższony, będąc odwrotnie proporcjonalny do średniej objętości krwinki (MCV). Dane te potwierdzają odkrycie, że ΔAl może być użyte jako sposób oceny zapasów tkankowych glinu, a odwrotna korelacja związana jest z hamującym jego wpływem na syntezę hemu i/lub dostępność żelaza (38). Jest to prawdopodobna przyczyna tłumacząca konieczność stosowania dużo wyższych dawek rHuEPO, co stwierdzono w obecnej pracy, przy braku istnienia jawnych objawów zatrucia glinem u pacjentów z podwyższonymi zapasami tkankowymi glinu. Terapia DFO może dostarczyć wskazówek odnośnie postępowania w przypadku tego typu hiporeaktywności na rHuEPO, ponieważ zatrucie glinem jest z reguły stanem odwracalnym za pomocą czynników chelatujących.

W badaniu przeprowadzonym przez Muirhead i wsp. na 22 pacjentach w wieku 26 – 74 lat (średnia wieku 53 ± SD 15,5) podawano rHuEPO w dawce 50 – 200 j./kg/tydzień przez okres 16,5 ± 8,0 miesięcy (zakres 3 – 27), co stanowiło znacznie dłuższy okres niż w przedstawionej pracy doktorskiej (118). Właściwe dawkowanie uzależniano od stężenia hemoglobiny, które utrzymywano na poziomie 11,5 – 13,0 g/dl. Dodatkowo podawano związki żelaza celem utrzymania stężenia ferrytyny w granicach > 200 ng/ml. Średni czas odpowiedzi na rHuEPO, który określono na podstawie wzrostu Hb > 2 g/dl ponad stężenie wyjściowe, wynosił 6,1 ± 2,6 tygodni. Nie stwierdzono korelacji stężenia iPTH zarówno z odpowiedzią na rHuEPO (w postaci wzrostu stężenia Hb), jak i z ostatecznym utrzymaniem jej dawki. Podsumowując dane z piśmiennictwa można twierdzić, że podwyższone stężenia glinu w surowicy chorych z PNN, związane z wyjściową opornością na rHuEPO, nie miało

trwałego wpływu na ustalenie właściwej dawki. Nie dowiedziono również wpływu iPTH na krótko- jak i na długoterminowe dawkowanie rHuEPO (118, 128).

W obecnej pracy zaobserwowano pozytywny wpływ podaży witaminy C na przełamanie oporności na rHuEPO u pacjentów z toksycznym stężeniem glinu w surowicy (stężenie Al powyżej 50 μg/l). Niestety, analogicznej odpowiedzi nie obserwowano u pacjentów ze stężeniem Al poniżej 50 μg/l oraz z nieprawidłowym stężeniem iPTH (powyżej 800 pg/ml).

Dwa lata obserwacji (zwłaszcza II rok badania), w którym suplementowano świadomie witaminę C hemodializowanymi chorym, dało pozytywną odpowiedź na wiele pytań.

Natomiast nie uzyskano odpowiedzi na pytania: jaką dawkę, lub wprost - Ile ci chorzy powinni dostawać witaminy C? Czy fakt podaży wpłynął znacząco na stan bariery antyoksydacyjnej? Niestety w obecnej pracy nie mierzono stężeń markerów antyoksydacyjnych, gdyż nie to było jej celem (problemy te powinny rozstrzygnąć dalsze badania). Opracowanie metodyki oznaczeń i opanowanie warsztatu mogą okazać się cennym doświadczeniem.

Warto jednak zastanowić się nad odpowiedzią na kolejne pytanie: Czy na ograniczonej liczbowo populacji chorych uda się – w badaniach obserwacyjnych – wykazać oczekiwane korzyści?

Przykładowo: 1 opakowanie witaminy C (50 tabl. a 100 mg) kosztuje ok. 2 złote. Czy w skali roku, w stosunku do kosztów dializoterapii sięgających 58 tysięcy złotych/pacjenta nie warto dodać jeszcze ok. 16 złotych (co prawdopodobnie i tak zrobili pacjenci w II etapie), by poprawić ich stan i zmniejszyć ryzyko powikłań?

Tak wiele za tak niewiele… Właściwe zachowanie prozdrowotne?

6. WNIOSKI

1. Stężenia witaminy C w populacji chorych hemodializowanych oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych wykazują sezonowość w zależności od pór roku.
2. Istotnie niższe stężenia witaminy C obserwowane w surowicy chorych dializowanych w porównaniu do grupy kontrolnej, wskazują na jej niedobór w tej grupie pacjentów.
3. Główną przyczyną niedoboru witaminy C u chorych hemodializowanych jest jej utrata z dializatem podczas zabiegu dializy.
4. Suplementacja witaminy C u chorych hemodializowanych poprawia odpowiedź na leczenie erytropoetyną, co prowadzi do wzrostu stężenia hemoglobiny i wartości hematokrytu oraz obniżenie zużycia rHuEPO.
5. Suplementacja witaminy C podczas hemodializy ułatwia uwalnianie zmagazynowanego żelaza, co przejawia się wzrostem jego stężenia w surowicy i poprawia saturację transferyny.
6. Korzystny wpływ leczenia witaminą C na parametry hematologiczne chorych dializowanych wskazuje na potrzebę suplementacji nią pacjentów, zwłaszcza w okresie jesienno-zimowym.

7. ANEKS

Tabela XXXI. Zalecenia dietetyczne dla chorych dializowanych (wg 95).

	Hemodializowani	**Dializowani otrzewnowo**	**Główne źródła**
Kaloryczność	30-35 kcal/kg	25-30 kcal/kg*	Pieczywo, produkty zbożowe, ryż, makarony, ziemniaki, tłuszcze
Białko	1-1,2 g/kg IBW **	1,2-1,3 g/kg IBW **	Mięso, ryby, jaja, nabiał, rośliny strączkowe
Potas	0,8-1 mmol/kg	Restrykcje tylko przy skłonności do hiperkaliemii: 1 mmol/kg	Owoce, warzywa, soki, orzechy, kawa, czekolada, chrupki
Sód	80-100 mmol	80-100 mmol	Sól kuchenna, żywność wędzona, konserwowa, dania garmażeryjne
Fosforany	<1000 mg	<1200 mg	Mleko, jogurty, sery, ryby, owoce morza, podroby
Płyny	Diureza + 500 ml	Diureza + ultrafiltracja otrzewnowa + 500 ml	Napoje, sosy, zupy, galaretki, jogurty, wywary

* dostosowane do zawartości kalorii z płynu do dializy otrzewnowej.

** IBW = V (objętość dystrybucji mocznika)/0,58.

Tabela XXXII. Zawartość kwasu askorbinowego oraz potasu w wybranych produktach spożywczych (wg 16)**.**

Nazwa produktu	Zawartość witaminy C w mg/100 g świeżej masy produktu	Zawartość potasu w mg/100 g świeżej masy produktu
Warzywa		
pietruszka – liście	269	695
brukselka	65- 145	416
kalarepa	70 -100	304
kapusta	35 -70	228
kalafior	50 – 70	214
szpinak	40 -84	480
fasolka szparagowa	25 – 30	264
rzodkiewka	25	236
sałata	12 – 30	134
pomidory	20 – 33	282
ziemniaki	20 – 33	557
Owoce		
owoce dzikiej róży	550	-
czarne porzeczki	150 – 300	336
truskawki	46 -90	133
kiwi	84	280
grejpfruty	30 – 70	277
cytryny	40 -60	125
pomarańcze	30 -50	183
porzeczki czerwone	26 – 63	259-275
agrest	25 – 40	230
maliny	19 - 37	203
jabłka	0,5 -20	134
banany	8 - 14	315

Tabela XXXIII. Zalecenia dotyczące dziennych dawek witamin rozpuszczalnych w wodzie dla pacjentów z niewydolnością nerek w okresie przeddializacyjnym, dializoterapii i po przeszczepieniu nerki oraz dla zdrowych osób (na podstawie: 48, 62, 108, 133, 144, 145)**.**

Witamina	**standard dla w/w**	**Zalecane normy witaminy dla zdrowych ludzi (z małą aktywnością fizyczną)**	
		Mężczyźni	**Kobiety**
B_1 (tiamina)	1,5 mg	1,8 mg	1,7 mg
B_2 (ryboflawina)	1,7 mg	2,4 mg	1,6 mg
B_{12} (kobalamina)	6 µg	3 µg	3 µg
H (biotyna)	300 µg	300 µg	100
Niacyna	20 mg	21 mg	19 mg
Kwas foliowy	0,8 do 1mg	0,8 do 1 mg	> 200 mg
B_5 (kwas pantotenowy)	10 mg	10 mg	100 mg
C (kwas askorbinowy)	60 mg (100 mg, gdy niedobór wit. C – do normalizacji stężenia)	60 mg	60 mg
B_6 (pirydoksyna)	10mg	2,0 mg	1,6 mg
A (kwas retinilowy)	Niezalecane	900 µg	700 µg
E (tokoferol)	Niezalecane	15 mg	15 mg
D (cholekalcyferol-aktywne metabolity lub analogi)	Indywidualnie	Indywidualnie	Indywidualnie

Tabela XXXIV. Rozkład zasobów żelaza w organizmie ludzkim (na podstawie: 137)**.**

Rozkład zasobów żelaza w organizmie ludzkim:	
Żelazo czynnościowe • Hemoglobina • Mioglobina • Enzymy (cytochromy, katalazy, peroksydazy, etc.)	ok. 60 % = 2,52 g ok. 9 % = 0,3 g ok. 0,9 % = 0,042 g
Żelazo zmagazynowane • Ferytyna • Hemosyderyna	ok. 22 % = 0,92 g ok. 8 % = 0,33 g
Żelazo transportowe • Transferyna	ok. 0,1 % = 0,004 g
Ogółem	100 % = 4,2 g

Tabela XXXV. Przyczyny oporności na erytropoetynę (wg: 92)**.**

• Przewlekła utrata krwi (krwawienia z dróg rodnych, z przewodu pokarmowego, częste pobieranie zbyt dużych ilości krwi do badań hematologicznych lub biochemicznych)
• Bezwzględny lub czynnościowy niedobór żelaza
• Ostre lub przewlekłe stany zapalne (zakażenia kanału cewnika używanego do dializy otrzewnowej lub hemodializy, gruźlica, AIDS, toczeń trzewny, reumatoidalne zapalenie stawów)
• Wtórna nadczynność przytarczyc z włóknieniem szpiku kostnego
• Zatrucie glinem
• Hemoliza uwarunkowana czynnikami genetycznymi (hemoglobinopatie), immunologicznymi (przeciwciała), fizycznymi (protezy zastawkowe) lub toksycznymi
• Zespoły wadliwego żywienia, trawienia lub wchłaniania (niedobory białkowe, witaminy C, B_6, B_{12}, E, kwasu foliowego)
• Nowotwory szpiku kostnego (szpiczak) lub inne nowotwory pozakostne
• Włóknienie szpiku kostnego (hiperparatyreoidyzm)
• Leki (antymitotyki, ketanseryna?, teofilina?, inhibitory konwertazy angiotensyny, blokery receptorów AT1)
• Nieadekwatna dializoterapia
• Inne czynniki (ciąża, niedoczynność tarczycy, hipogonadyzm, ciężka kwasica nieoddechowa, glikowane białka – AGE, hiperhomocysteinemia, niedobór karnityny, niedobór leptyny, zatrucie żelazem)
• Przeciwciała przeciwerytropoetynowe (PRCA), neutralizujące rHuEPO lub endogenną erytropoetynę

Tabela XXXVI. Tabela wartości referencyjnych.

Wartości referencyjne Pracowni Biochemicznej Katedry Biochemii Klinicznej CMUJ:

Parametr	Jednostki/zakresy
Hemoglobina	(Kobiety) 12 - 16 g/dl, (Mężczyźni) 13 - 18 g/dl
Hematokryt	(Kobiety) 36 – 45 %, (Mężczyźni) 40 – 54 %
Ferrytyna	13 – 400 ng/ml
TIBC	44,8 – 73,4 µmol/l
Żelazo	10,60 – 28,30 µmol/l
Albumina	35 – 50 g/l
Mocznik	1,7 – 8,3 mmol/l
Kreatynina	53 – 124 µmol/l
Potas	3,5 – 5,5 mmol/l
Fosforany	0,87 – 1,45 mmol/l
Wapń całkowity	2,02 – 2,61 mmol/l
Witamina B_{12}	200 – 900 pg/ml
Witamina C	54 – 76 µmol/l
Kwas foliowy	> 5,31 ng/ml

Wartości referencyjne Medycznego Centrum Laboratoryjne DIAGNOSTYKA:

Parametr	Jednostki/zakresy
Parathormon	12 – 72 pg/ml

Wartość referencyjne Pracowni Biopierwiastków w Zakładzie Bromatologii, CMUJ:

Parametr	Jednostki/zakresy
Glin	< 20 µg/l
Glin (poziom subtoksyczny)	20 – 50 µg/l
Glin (poziom toksyczny)	> 50µg/l

8. PIŚIEMNICTWO

1. Alu R.H., Wodo M., Longo J., Marcotte A. L., Campione A. L., Moore M. K., Lynch S. M.: Vitamin C protects low-density lipoprotein from homocysteine-mediated oxidation. Free Radic. Biol. Med. 2003, 7, 881-891.
2. Ashton T., Young I.S., Peters J.R., Jones E., Jackson S.K., Davies B., Rowlands C.C.: Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. J. Appl. Physiol. 1998, 87, 2032-2036.
3. Bakaev V.V., Efremov A.V., Tityaev I.I.: Low levels of dehydroascorbic acid in uraemic serum and the partial correction of dehydroascorbic acid deficiency by haemodialysis. Nephrol. Dial. Transplant. 1999, 14, 1472-1474.
4. Bakaev V.V., Efremov A.V.: The excretion of ascorbic acid and its metabolites in uremia and hemodialysis. Patol. Fiziol. Eksp. Ter. 2000, 2, 22-24.
5. Ball M. J., Bartlett M. A.: Dietary intake and iron status of Australian vegetarian women. Am. J. Clin. Nutr. 1999, 70, 353-358.
6. Barclay P.G., Fischer E.R., Harris D.C.H.: Interpatient variation in response to subcutaneous versus intravenous low dose erythropoietin. Clin. Nephrol. 1993, 40, 277-280.
7. Bartoń H., Zachwieja Z., Fołta M., Janusz-Grzybowska E., Stompór T., Sułowicz W., Brzezicka M.: Badania pilotażowe poziomu glinu w osoczu osób zdrowych w Polsce. Przegl. Lek. 2003, 60, 111-114.
8. Bessey O. A., Lowry O. H.: Some preliminary biochemical findings in junior high school children in Syracuse and Onondage Country, New York. Amer. J. Clin. Nutri. 1965, 17, 218-222.
9. Block G., Mangels A.R., Patterson B.H., Levander O.A., Norkus E.P., Taylor P.R.: Body weight and prior depletion effect on plasma ascorbate levels attained on identical vitamin C intake: a controlled-diet study. J. Am. Coll. Nutr. 1999, 18, 628-637.
10. Bobrowicz E., Naskalski J., Siedlecki A.: Preanalytical factors in human plasma ascorbate assay. Clin. Chim. Acta 2001, 314, 237-239.
11. Bohm V., Tiroke K., Schneider S., Sperschneider H., Stein G., Bitsch R.: Vitamin C status of patients with chronic renal failure, dialysis patients after renal transplantation. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 1997, 67, 262-266.
12. Bonnefont-Rousselot D., Lehmann E., Jaudon M. C., Delattre J., Perrone B., Rechke J.P.: Blood oxidative stress and lipoprotein oxidizability in haemodialysis patients: effect of

the use of a vitamin E-coated dialysis membrane. Nephrol. Dial. Transplant. 2000, 15, 2020-2028.

13. Borawski J.: Leki a erytropoeza w chorobach nerek i transplantacji nerek. Nefrol. Dial. Pol. 1999, 3, 179-183.
14. Braun J.: Erythrocyte zinc protoporphyrin. Kidney Int. 1999, 55, 57- 60.
15. Bron A.A., Hu F.B.: Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. Am. J. Clin. Nutr. 2001, 73, 673-686.
16. Bułhak-Jachymczyk B., Niedźwiecka-Kącik D., Panczenko-Kresowska B., Wartanowicz M., Ziemlański Ś.: Normy żywienia człowieka. (W:) Fizjologiczne Podstawy, pod redakcją Ś. Ziemiański. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. 2001, 198-211.
17. Burns D.L., Pomposelli J.J.: Toxicity of parenteral iron dextran therapy. Kidney Int. 1999, 55, 119–124.
18. Carr A. C., Frei B.: Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. Am. J. Clin. Nutr. 1999, 69, 1086-1107.
19. Chattopadhyay A., Choudhury T.D., Bandyopadhyay D., Datta A.G.: Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical. Biochem. Pharmacol. 2000, 59, 419-425.
20. Chazot C., Laurent G., Charra B., Blanc C., VoVan C., Jean G., Vanel T., Terrat J.C., Ruffet M.: Malnutrition in long-term haemodilaysis survivors. Nephrol. Dial. Transplant. 2001, 16, 61-69.
21. Chen W.T., Lin Y.F., Yu F.C., Kao W.Y., Huang W.H., Yan H.C.: Effect of ascorbic acid administration in hemodialysis patients on in vitro oxidative stress parameters: influence of serum ferritin levels. Am. J. Kidney Dis. 2003, 42, 158-166.
22. Ciechanowicz A.: Nowe elementy w patogenezie miażdżycy. Nefrol. Dial. Pol. 2001, 5, 153-154.
23. Ciechanowski K.: Choroby nerek w pierwotnych hiperlipoproteinemiach. Nefrol. Dial. Pol. 2001, 5, 155-156.
24. Clarke R., Collins R., Lewington S., Phil D., Donald A., Alfthan G.: Homocysteina a ryzyko choroby niedokrwiennej serca i udaru mózgu. JAMA, 2003, 5, 210-219.
25. Clarkson P.M., Thompson H.S.: Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? Am. J. Clin. Nutr. 2000, 637-646.
26. Clermount G., Lecour S., Lahet J., Siohan P., Vergely C., Chevet D., Rifle G., Rochette L.: Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis

patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. Cardiovasc. Res. 2000, 47, 618-623.

27. Consensus Conference of EDTA-ERA: Diagnosis and treatment of aluminium overload in end-stage renal failure patients. Nephrol. Dial.Transplant Suppl. 1993, 1, 1-4.
28. Cook J.D., Reddy M.B.: Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. Am. J. Clin. Nutr. 2001, 73, 93-98.
29. Cross J.M., Donald A.E., Nuttall S.L., Deanfield J.E., Woolfson R.G., Macallister R.J.: Vitamin C improves resistance but not conduit artery endothelial function in patients with chronic renal failure. Kidney Int. 2003, 63, 1433-1442.
30. Czekalski S., Rutkowski B., Chrzanowski W., Ciechanowski K., Klinger M., Książek A., Manitius J., Myśliwiec M., Oko A., Sułowicz W., Wańkowicz Z., Więcek A.: Zalecenia Zespołu Krajowego Konsultanta Medycznego w Dziedzinie Nefrologii dotyczące postępowania zachowawczego u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek. Nefrol. Dial. Pol. 2002, 6, 197-202.
31. D'Haese P.C.D., Couttenye M.M., Goodman W.G., Lemoniatou E., Digenis P., Sotornik I., Fagalde A., Barsoum R.S., Lamberts L.V., De Broe M. E.: Use of the low-dose desferrioxamine test to diagnose and differentiate between patients with aluminium – related bone disease, increased risk for aluminium toxicity, or aluminium overload. Nephrol. Dial. Transplant. 1995, 10, 1874-1884.
32. De Schoenmakere G., Lameire N., Dhondt A., Van Loo A., Van der Goten J., Duym P., Vanholder R.: The haematopoietic effect of recombinant human erythropoietin in haemodialysis is independent of the mode of administration (i.v.or s.c.). Nephrol. Dial. Transplant. 1998, 13, 1770-1775.
33. Deicher R, Hörl W.H., Vitamin C for hyporesponsiveness to EPO: a cure for all? Am. J. Kidney Dis. 2003, 42, 1848-1849.
34. Deicher R., Ziai F., Habicht A., Schillinger M., Hörl W. H.: Vitamin C plasma level and response to erythropoietin in patients on maintenance haemodialysis. Nephrol. Dial.Transplant. 2004, 19, 2319-2324.
35. Delvin E.E., Rozen R., Merouani A., Genest J., Lambert M.: Influence of methylenetrahydrofolate reductase genotype, age, vitamin B12, and folate status on plasma homocysteine in children. Am. J. Clin. Nutr. 2000, 72, 1469-1473.

36. Der-Cherng T., Huang T.: A parallel, comparative study of intravenous iron versus intravenous ascorbic acid for erythropoietin-hyporesponsive anaemia in haemodilaysis patients with iron overload. Nephrol. Dial. Transplant. 1998, 13, 2867-2872.
37. Der-Cherng T., Huang T.P.: Recombinant human erythropoietin resistance in iron-repleted hemodialysis patients: Role of aluminum toxicity. Am. J. Nephrol. 1998, 18, 1-8.
38. Der-Cherng T., Tung-Po H., Tzen W. C., Wu-Chang Y.: Erythropoietin hyporesponsiveness: From iron deficiency to iron overload. Kidney Int. 1999, 55, 107-118.
39. Der-Cherng T., Tung-Po H., Yau-Huei W., Benjamin I.T., Wu-Chang Y.: Intravenous ascorbic acid as an adjuvant therapy for recombinant erythropoietin in hemodialysis patients with hyperferritinemia. Kidney Int. 1999, 55, 2477-2486.
40. Der-Cherng T., Tung-Po H., Yau-Huei W.: Erythropoietin and iron: the role of ascorbic acid. Nephrol. Dial. Transplant. 2001, 16, 35-39.
41. Descombes E., Boulat O., Perriard F., Fellay G.: Water-soluble vitamin levels in patients undergoing high-flux hemodialysis and receiving long-term oral postdialysis vitamin supplementation. Artif. Organs. 2000, 24, 773-778.
42. Dhariwal K.R., Hartzell W.O., Levine M.: Ascorbic acid and dehydroascorbic acid measurements in human plasma and serum. Am. J. Clin. Nutr. 1991, 54, 712-716.
43. Dhariwal K.R., Washko P., Hartzell W.O., Levine M.: Ascorbic acid within chromaffin granules. In situ kinetics of norepinephrine biosynthesis. J. Biol. Chem. 1989, 264, 15404-15409.
44. Dharmarajan T.S., Norkus E.P.: Sposoby postępowania w stanach niedoboru witaminy B_{12}. Medycyna po Dyplomie 2002, 11, 124-132.
45. Dincer Y., Akcay T., Konukoglu D., Hatemi H.: Erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation in patients with coronary atherosclerosis. Acta Med. Okayama. 1999, 53, 259-264.
46. Donnelly S. M., Mahmound A. M., Churchhill D. N.: Bioavailability of iron in hemodailysis patients treated with erythropoietin: evidence for the inhibitory role of Aluminum. Am. J. Kidney Dis. 1990, 5, 477-451.
47. Drüeke T. B., Lacour B., Touam M., Jucquel J., Plachot J.J., Cournot-Witmer G., Galle P.: Effect of aluminium on hematopoiesis. Kidney Int. 1986, 29, 45-48.

48. Ducloux D.: Nutrition regimen for continuous renal replacement therapy used in critically ill patients: rule of micronutrients. Vitamins and trace elements. Clin. Nephrol. 1997, 47, 37-46.
49. Eknoyan G.: The importance of early treatment of the anaemia of chronic kidney disease. Nephrol. Dial. Transplant. 2001, 16, 45-49.
50. Eschbach J., Adamson J. W.: Iron overload in renal failure patients: changes since the introduction of erythropoietin therapy. Kidney Int. 1999, 55, 35-43.
51. Esteve M.J., Farre R., Frigola A., Garcia-Cantabella J.M.: Determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in blood plasma and serum by liquid chromatography. J. Chromatogr. B. 1997, 688, 345-349.
52. Fishbane S., Mittal S. K., Maesaka J.K.: Beneficial effects of iron therapy in renal failure patients on hemodialysis. Kidney Int. 1999, 55, 67-70.
53. Fissell R. B., Bragg-Gresham J.L., Gillespie B. W., Goodkin D. A., Bommer J., Saito A., Akiba T., Port D. A., Young E. W.: International variation in vitamin prescription and association with mortality in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). Am. J. Kidney Dis. 2004, 44, 293-299.
54. Fleming D.J., Tucker K.L., Jacques P.F., Dallal G.E., Wilson P.W.F., Wood R.J.: Dietary factors associated with the risk of high iron stores in the elderly Framingham Heart Study cohort Am. J. Clin. Nutr. 2002, 76, 1375-1384.
55. Franek E., Kokot F., Więcek A., Kokot M.: Wpływ dożylnego podania żelaza na wydzielanie erytropoetyny u osób zdrowych. Nefrol. Dial. Pol. 1997, 1, 156-158.
56. Fresenius Medical Care: ESRD Patients in 2003: A Global Perspective. 2003, 1-10.
57. Gale C. R., Ashurst H. E., Powers H. J., Martyn C. N.: Antioxidant vitamin status and carotid atherosclerosis in the elderly. Am. J. Clin. Nutr. 2001, 74, 402-408.
58. Gastaldello K., Vereerstraeten A., Nzame-Nze T., Vanherweghem J.L.: Resistance to erythropoietin in iron-overloaded haemodialysis patients can be overcome by ascorbic acid administration. Nephrol. Dial. Transplant. 1995, 10, 44-47.
59. Gerster H.: No contribution of ascorbic acid to renal calcium oxalate stones. Ann. Nutri. Metab. 1997, 41, 269-282.
60. Giancaspro V., Nuzziello M., Pallotta G., Sacchetti A., Petrarulo F.: Intravenous ascorbic acid in hamodialysis patients with functional iron deficiency: a clinical trial. J. Nephrol. 2000, 13, 444-449.

61. Goldberg A.: The enzymatic formation of haem by the incorporation of iron into protoporphyrin; Importance of ascorbic acid, ergothioneine and glutathione. Brit. J. Haemat. 1959, 5, 150-157.
62. Gonick H., Makoff R.: Renal failure and the concomitant derangement of micronutrient metabolism. Nutr. Clin. Pract. 1999, 14, 238-246.
63. Graham I.M., O'Callaghan P.: Vitamins, homocysteine and cardiovascular risk. Cardiovasc. Drugs Ther. 2002, 16, 383-389.
64. Ha T.K.K., Sattar N., Talwar D., Cooney J., Simpson K., O'Reilly D.St.J., Lean M.E.J.: Abnormal antioxidant vitamin and carotenoid status in chronic renal failure. QJM. 1996, 89, 765-769.
65. Hartwich J., Kwaśniak J., Wybrańska I., Dembińska-Kieć A.: Biochemia kliniczna i diagnostyka zaburzeń gospodarki lipidowej. W: Dembińska-Kieć Naskalski J. Diagnostyka Laboratoryjna z Elementami Biochemii Klinicznej; Wrocław, 1998; 549-551, 566-569.
66. Helbig G., Hołowiecki J.: PRCA - wybiorcza aplazja układu czerwonokrwinkowego, etiologia, patogeneza, czynniki ryzyka. Nefrol. Dial. Pol. 2002, 6, 203-206.
67. Herbaczynska-Cedro K., Wartanowicz M., Panczenko-Kresowska B., Cedro K. Klosiewicz-Wasek B., Wasek W.: Inhibitory effect of vitamin C and E on the oxygen free radical production in human polymorphonuclear leukocytes. Eur. J. Clin. Invest. 1994, 24, 316-319.
68. Hermann A., Manitius J., Rutkowski B., Łysiak-Szydłowska W.: Homocysteina w chorobach nerek. Nefrol. Dial. Pol. 2000, 4, 10-13.
69. Hmida M.B., Hachicha J., Kamoun K., Hamida N., Kaddour N., Bahloul Z., Jlidi R., MD; Jarraya A., MD.: Two cases of oxalosis as a cause of resistance to Recombinant Human Erythropoietin. Dial. Transplant. 1996, 25, 857-860, 879-880.
70. Hörl W.H.: Is there a role for adjuvant therapy in patients being treated with epoetin? Nephrol. Dial. Transplant. 1999, 14, 50-60.
71. Huang H., Appel L.J., Croft K.D., Miller III E.R., Mori T.A., Puddey I.B.: Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation results of a randomized controlled trial. Am. J. Clin. Nutr. 2002, 76, 549-555.
72. Hultqvist M., Hegbrant J., Nilsson-Thorell C., Lindholm T., Nilsson P., Linden T., Hultqvist-Bengtsson U.: Plasma concentrations of vitamin C, vitamin E and/or

malondialdehyde as markers of oxygen free radical production during hemodialysis. Clin. Nephrol. 1997, 47, 37-46.

73. Iannuzzi A., Celentano E., Panica S., Galasso R., Covetti G., Sacchetti L., Zarrilli F., De Michele M., Rubba P.: Dietary and circulating antioxidant vitamins in relation to carotid plaques in middle- aged women. Am. J. Clin. Nutr. 2002, 76, 582-587.
74. Idzior-Waluś B., Cieślik G.: Przewlekłe powikłania cukrzycy a homocysteina. Przegl. Lek. 2000, 57, 732-735.
75. Interdepartmental Committee on Nutrition for National Defense (ICNND) Manual for Nutrition Survey. Bethesda. 1963.
76. Jackson P., Loughrey C.M., Lightbody J.H., McNamee P.T., Young I.S.: Effect of hemodialysis on total anioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. Clin. Chem. 1995, 41, 1135-1138.
77. Jenson J.D., Madsen J.K., Jensen L.W.: Comparison of dose requirement, serum erythropoietin and blood pressure following intravenous and subcutaneous erythropoietin treatment of dialysis patients. Eur. J. Clin. Pharmacol. 1996, 50, 171-177.
78. Jones C. H., Richardson D., Ayers S., Newstead C. G., Will E. J., Davison A. M., Percentage hypochromic red cells and the response to intravenous iron therapy in anaemic haemodialysis patients. Nephrol. Dial. Transplant. 1998, 13, 2873-2876.
79. Kaiser L., Burnatowska-Hledin M.A., Schwartz K.A., Mayor G.H.: Microcytic anemia secondary to intraperitoneal aluminum in the rat. Kidney Int. 1983, 23, 152.
80. Kallner A.B., Hartmann D., Hornig D.H.: On the requirements of ascorbic acid in man: steady-state turnover and body pool in smokers. Am. J. Clin. Nutr. 1981, 34, 1347-1355.
81. Kaltwasser J.P., Gottschalk R.: Erythropoietin and iron. Kidney Int. 1999, 55, 49- 56.
82. Kasvosve I., Delanghe J.R., Gomo Z.A.R., Gangaidzo I.T., Khumalo H., Langlois M.R., Moy V. M., Saungweme T., Mvundura E., Boelaert J.R., Gordeuk V.R.: Effect of transferrin polymorphism on the metabolizm of witamin C in Zimbabwean adults. Am. J. Clin. Nutr. 2002, 75, 321-325.
83. Kayamori Y., Katayama Y., Urata T.: Nonenzymatic elimination of ascorbic acid in clinical samples. Clin. Biochem. 2000, 33, 25-29.
84. Kędziora-Kornatowska K., Błaszczyk J., Pawlak W., Kędziora J., Luciak M.: Niektóre wskaźniki metabolizmu tlenowego we krwi obwodowej w nefropatii cukrzycowej u chorych na cukrzycę typu 2. Nefrol. Dial. Pol. 2001, 4, 177-179.

85. Kędziora-Kornatowska K., Błaszczyk J., Pawlak W., Kędziora J., Luciak M.: Próby farmakologicznej modyfikacji stresu oksydacyjnego w nerce w cukrzycy doświadczalnej u szczurów. Nefrol. Dial. Pol. 2001, 4, 180-181.
86. Keven K.,, Kutlay S., Nergizoglu G., Erturk S.: Dialysis Therapies Randomized, Crossover Study of the effect of Vitamin C on EPO response in hemodialysis patients. Am. J. Kidney Dis. 2003, 41, 1233-1239.
87. Khajehdehi P., Mojerlou M., Behzadi S., Rais-Jalali G.A.: A randomized, double-blind, placebo-controlled trail of supplementary vitamin E, C and their combination for treatment of haemodialysis cramps. Nephrol. Dial. Transplant. 2001, 16, 1448-1451.
88. Khajehdehi P.: Effect of vitamins on the lipid profile of patients on regular hemodialysis. Scand. J. Urol. Nephrol. 2000, 34, 62-66.
89. Kletzmayr J., Mayer G., Legenstein E., Heinz-Peer G., Leitha T., Hörl W.H., Kovarik J.: Anemia and carnitine supplementation in hemodialyzed patients. Kidney Int. 1999, 55, 93-106.
90. Klipstein-Grobusch K., Geleijnse J. M., Breeijen J. H., Boeing H., Hofman A., Grobbee D. E., Witteman J. C. M.: Dietary antioxidants and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. Am. J. Clin. Nutr. 1999, 69, 261-266.
91. Kokot F., Rutkowski B. Oporność na erytropoetynę u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek. (W:) Erytropoetyna od odkrycia do zastosowań klinicznych. Pod red. B. Rutkowskiego. MAKmed wyd. I Gdańsk 2001. S. 26-64.
92. Kokot F., Rutkowski B.: Oporność na erytropoetynę u chorych chorych przewlekłą niewydolnością nerek. (W:) Niedokrwistość u chorych z przewlekłą niewydolnośćią nerek przed rozpoczęciem leczenia nerkozastępczego. Pod red. F. Kokota, E. Franka, Medical Press wyd. I, Gdańsk 2003, 39-48.
93. Kozłowska I., Różański, Ciechanowski K.: Hiperhomocysteinemia i jej aterogenne działanie u chorych chorych niewydolności nerek. Pol. Arch. Med. Wew. 2003, 8, 899-903.
94. Kunachowicz H., Nadolna I., Przygoda B., Iwanow K.: Tabele wartości odżywczej produktów spożywczych (Food composition tables). Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa 1998.
95. Levy J., Morgan J., Bron E.: Nutrition on dialysis (W:) Oxford handbook of dialysis. Oxford University Press 2001, 377-400.

96. Locatelli F., Canaud B., Eckardt K., 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.
97. Loria C.M., Klag M.J., Caulfield L.E., Whelton P.K.: Vitamin C status and mortality in US adults. Am. J. Clin. Nutr. 2000. 72, 139-145.
98. Loria C.M., Sempos C.T., Vuong C.: Plan and operation of the NHANES II Mortality study. 1992, Vital Health Stat.1999, 38, 1-16.
99. Lykkesfeldt J., Christen S., Wallock L.M., Chang H. H., Jacob R. A., Ames B. N.: Ascorbate is depleted by smoking and repleated by moderate supplementation: a study in male smokers and nonsmokers with matched dietary antioxidant intakes. Am. J. Clin. Nutr. 2000, 71, 530-536.
100. MacCormik D. B., Greene H. L.: Vitamins. (W:) Tietz Textbook of Clinical Chemistry, pod redakcją C. A. Burtis, E. R. Ashwood. Second Edition W. B. Sanders Company. Philadelphia, London 1994, 1311-1316.
101. Macdougall I.: Present and future strategies in the treatment of renal anaemia. Nephrol. Dial. Transplant. 2001, 16, 50-55.
102. Macdougall I.C.: Iron therapy: overview and recommendations. Przegl. Lek. 1998, 55, 72-73.
103. Macdougall I.C.: Meeting the challenges of a new millennium: optimizing the use of recombinant human erythropoietin. Nephrol. Dial. Transplant. 1998, 13, 23-27.
104. Macdougall I.C.: Strategies for iron supplementation: Oral versus intravenous. Kidney Int. 1999, 55, 61-66.
105. Majdan M., Pietrzak I., Rutkowski B.: Leczenie uzupełniajace u pacjentów poddawanych terapii erytropoetyną. (W:) Erytropoetyna od odkrycia do zastosowań klinicznych. Pod red B. Rutkowskiego. Wydawnictwo Medyczne MAKmed; Gdańsk 2001, 115-126.
106. Makoff R.: Antioxidants: Are they a nutritional boon for renal patients? Cont. Dial. Nephrol. 1994, 21-23.
107. Makoff R.: Suggested dosing regimens, and are antioxidants appropriate for renal patients? Cont. Dial. Nephrol. 1995, 6, 42-49.
108. Makoff R.: The difficulty in assessing the vitamin status of dialysis patients. Cont. Dial. Nephrol. 1996, 7, 42-49.
109. Makoff R.: Vitamin replacement therapy in renal failure patients. Miner. Electrolyte Metab. 1999, 25, 349-351.

110. Makoff R.: Vitamin supplementation, shark cartilage and the renal patient. Cont. Dial. Nephrol. 1995, 8, 30-34.
111. Marangella M., Petrarule M., Mandolfo S., Vitale C., Cosseddu D., Linari F.: Plasma profiles and dialysis kinetics of oxate in patients receiving hemodialysis. Nephron, 1992, 60, 74-80.
112. Mashour S., Turner J.F.J., Merrell R.: Acute renal failure, oxalosis, and vitamin C supplementation: a case report and review of the literature. Chest 2000, 118, 561-563.
113. Mayes P.A.: Struktura i funkcja witamin rozpuszczalnych w wodzie.(W:) Biochemia Harpera, pod redakcją R. K. Murray, Grunner, Mayes, Rodwell. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 1995, 708-709.
114. Miyata T., Wada Y., Cai Z., Iida Y. Horie K., Yasuda Y., Maeda K., Kurokawa K., Van Ypersele de Strihou C.: Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. Kidney Int. 1997, 51, 1170-1181.
115. Moller P., Loft S.: Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. Am. J. Clin. Nutr. 2002, 76, 303-310.
116. Morena M., Cristol J., Bosc J., Tetta C., Forret G., Leger C., Delcourt C., Papoz L., Descomps B., Canaud B.: Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. Nephrol. Dial. Transplant. 2002, 17, 422-427.
117. Morena M., Cristol J.P., Canaud B.: Why hemodialysis patients are in a prooxidant state? What could be done to correct the pro/antioxidant imbalance. Blood Purif. 2000, 18, 191-199.
118. Muirhead N., Hodsman A. B., Hollomby D.J., Cordy P.E.: The role of Aluminium and the parathyroid hormone in erythropoietin resistance in haemodialysis patients Nephrol. Dial. Transplant. 1991, 6, 342-345.
119. Nakayama H., Akiyama S., Inagaki M., Gotoh Y., Oguchi K.: Dehydroascorbic acid and oxidative stress in haemodialysis patients. Nephrol. Dial. Transplant. 2001, 16, 574-579.
120. Naskalski J.W., Bartosz G.: Oxidative modifications of protein structures. Adv. Clin. Biochem. 2000, 35, 161-254.
121. Nguyen-Khoa T., Massy Z.A., Witko-Sarsat V., Thevenin M., Touam M., Lambrey G., Lacour B., Drueke T.B., Descamps-Latscha B.: Critical evaluation of plasma and LDL oxidant-trapping potential in hemodialysis patients. Kidney Int. 1999, 56, 747-753.

122. Nissenson A.R., Strobos J.: Iron deficiency in patients with renal failure. Kidney Int. 1999, 55, 18-21.
123. Nowicki M.: Zaburzenia przemiany witaminowej. (W:) Interna. T III, pod redakcją W. Januszewicza, F. Kokota. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. 2001, 1205-1221.
124. Ostrowski J., Rutkowski B.: Wolne rodniki w nefrologii. Nefrol. Dial., Pol. 2000, 4, 14-18.
125. Padayatty S. J., Levine M.: Vitamin C and myocardial infarction: the heart of the matter. Am. J. Clin. Nutr. 2000, 71, 1027-1028.
126. Patruta S.I., Hörl W.H.: Iron and infection. Kidney Int. 1999, 55, 125–130.
127. Penniston J.T., Graf E., Itan T.: Calmodulin regulation of the Ca2+ pump of erythrocyte membranes. Ann. N.Y. Acad. Sci. USA. 1980, 356, 245-257.
128. Polak G., Stróżecki P., Adamowicz A., Odrowąż-Sypniewska G., Manitius J.: Skuteczność leczenia ludzką rekombinowaną erytropoetyną chorych hemodializowanych z wtórną nadczynnością przytarczyc. Nefrol. Dial. Pol. 2000, 4, 169-172.
129. Ponka P.: Cellular iron metabolism. Kidney Int. 1999, 55, 2-11.
130. Richardson D., Bartlett C., Will E.J.: Intervention thresholds and ceilings can determine the haemoglobin outcome distribution in a haemodialysis population. Nephrol. Dial. Transplant. 2000, 15, 2007-2013.
131. Riemersma R. A., Carruthers K. F., Elton R. A., Fox K. A. A.: Vitamin C and the risk of acute myocardial infarction. Am J. Clin. Nutr. 2000, 71, 1181-1186.
132. Riviere S., Birlouez-Aragon I., Nourhashemi F., Vellas B.: Low plasma vitamin C in Alzheimer patients despite an adequate diet. Int. J. Geriatr. Phychiatry. 1998, 13, 749-754.
133. Rocco M., Makoff R.: Appropriate vitamin therapy for dialysis patients. Semin. Dial. 1997, 10, 272-277.
134. Rümelin A., Fauth U., Halmagyi M.: Determination of ascorbic acid in plasma and urine by High Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection. Clin. Chem. Lab. Med. 1999, 37, 533–536.
135. Rutkowski B., Czekalski S.: Wybiorcza aplazja układu czerwonokrwinkowego u pacjentów leczonych erytropoetyna - mity i fakty. Nefrol. Dial. Pol. 2002, 6, 207-211.
136. Rutkowski B., Debska-Ślizień A., Bobeł-Olchowik B., Sułowicz W., Drożdż M., Książek A., Skublewska-Bednarek A., Jodkowski J., Kraśniak A.: Ocena skuteczności i bezpieczeństwa stosowania ludzkiej rekombinowanej erytropoetyny omega u

pacjentów leczonych powtarzanymi hemodializami-analiza wstępna. Nefrol. Dial. Pol. 2000, 4, 19-25.

137. Rutkowski B.: Wyrównanie niedoborów żelaza u pacjentów leczonych erytropoetyną (EPO- doustnie czy dożylnie?). Nefrol. Dial. Pol. 2001, 5, 125-128.
138. Rutkowski B.: Ludzka Rekombinowana Erytropoetyny – jedno z największych odkryć biotechnologii. (W:) Erytropoetyna od odkrycia do zastosowań klinicznych. Pod red. B. Rutkowskiego. MAKmed wyd.I Gdańsk 2001. S. 13-15.
139. Rutkowski B., Dębiska-Ślizień A., Więcej A., Biedunkiewicz B.: Rozpoznawanie i leczenie niedokrwistości nerkopochodnej. (W:) Standardy postępowania w rozpoznawaniu i leczeniu chorób nerek. Pod red. B. Rutkowskiego i S. Czekalskiego. MAKmed wyd.I Gdańsk 2001. S. 203-225.
140. Schaefer R., Schaefer L.: Hypochromic red blood cells and reticulocytes. Kidney Int. 1999, 55, 44-48.
141. Schmaldienst S., Hörl W.H.: Degranulation of polymorphonuclear leukocytes by dialysis membranes – the mystery clears up? Nephrol. Dial. Transplant. 2000, 15, 1909-1910.
142. Schneider M.P., Klingbeil A.U., Delles C., Schmidt B.M.W., John S., Schmieder R.E.: Vitamin C augments the renal response to L-arginine in smokers. Nephrol. Dial. Transplant. 2003, 18, 1512 -1517.
143. Sezer S., Ozdemir F. N., Yakupoglu U., Arat Z., Turan M., Haberal M.: Intravenous ascorbic acid for erythropoietin–hyporesponsive anemia in iron loaded hemodialysis patients. Artif. Organs. 2002, 26, 366-370.
144. Shah G.M., Ross E. A., Sabo A., Pichon M., Bhagavan H., Reynolds R.: Ascorbic acid supplements in patients receiving chronic peritoneal dialysis. Am. J. Kidney Dis. 1991, 18, 84-90.
145. Shah G.M., Ross E. A., Sabo A., Pichon M., Reynolds R., Bhagavan H.: Effects of ascorbic acid and pyridoxine supplementation on oxalate metabolism in peritoneal dialysis patients. Am. J. Kidney Dis. 1992, 20, 42-49.
146. Sharma D.C., Mathur R.: Correction of anemia and iron deficiency in vegetarians by administration of ascorbic acid. Indian. J. Physiol. Pharmacol. 1995, 39, 403-406.
147. Silverberg D.S., Blum M., Agbaria Z., Schwartz D., Zubkov A., Yachnin T., Iaina A.: Intravenous iron for the treatment of predialysis anemia. Kidney Int. 1999, 55, 79-85.

148. Smorczewska-Czupryńska B., Ustymowicz-Farbiszewska J., Karczewski J.K., Lach J.: Ocena zawartości witamin w poszczególnych porach w dietach młodzieży gimnazjalnej zamieszkałej w Białymstoku. Przegl. Lek. 2003, 60, 57-59.
149. Steciwko A.: Fizjologia hemodializy. (W:) Dializoterapia w codziennej praktyce. Pod red. B. Rutkowskiego. MAKmed wyd. I Gdańsk 1994, 59-65.
150. Steinberg F., Chait A.: Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers. Am. J. Clin. Nutr. 1998, 68, 319-327.
151. Stompór T., Sułowicz W.: Zespoł Malnutrition – Inflammation - Atherosclerosis (MIA) - istotna przyczyna zwiększonej chorobowości i śmiertelności pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek. Nefrol. Dial. Pol. 2002, 6, 65-73.
152. Sullivan J.F., Einstein A.B.: Ascorbic acid depletion in patients undergoing chronic hemodialysis. Am. J. Clin. Nutr. 1970, 23, 1339-1346.
153. Sullivan J.L.: Iron therapy and cardiovascular disease. Kidney Int. 1999, 55, 135 – 137.
154. Sułowicz W., Tenerowicz R., Giza D., Pietrzyk J. A., Kowalczyk-Michalek M.: Biozgodność leczenia hemodializa. Med. Metabol. 1999, 1, 60-72.
155. Sunder-Plassmann G., Hörl W. H.: Novel aspects of erythropoietin response in renal failure patients. Nephrol. Dial. Transplant. 2001, 16, 40-44.
156. Swartz R., Dombrouski J., Burnatowska-Hiedin M., Mayor G.: Microcytic anemia in dialysis patients: reversible marker of aluminum toxicity. Am. J. Nephrol. 1987, 9, 217-223.
157. Świerczyński J., Nogalska A., Rutkowdki B.: Erytropoetyna – regulacja, biosynteza i mechanizm jej działania.(W:) Erytropoetyna od odkrycia do zastosowań klinicznych. Pod red. B. Rutkowskiego. MAKmed wyd. I Gdańsk 2001. S. 26-64.
158. Szpona L., Wolnicka K., Rychli E.: Album fotografii produktów produktów potraw. Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa 2000.
159. Taylor A., Jacques P.F., Chylack Jr.L.T., Hankinson S.E., Khu P.M., Rogers G., Friend J., Tung W., Wolfe J. K., Padhye N., Willen W. C.: Long-term intake of vitamins and carotenoids and odds of early age-related cortical and posterior subcapsular lens opacities. Am. J. Clin. Nutr. 2002, 75, 504-549.
160. Taylor J.E., Belch J.J., Fleming L.W., Mactier R.A., Henderson I.S., Stewart W.K.: Erythropoietin response and route of administration. Clin. Nephrol. 1991, 41, 297-302.
161. Tessitore N., Solero G.P., Lippi G., Bassi A., Faccini G.B., Bedogna V., Gammaro L., Brocco G., RestivoG., Bernich P., Lupo A., Maschio G.: The role of iron status markers in

predicting response to intravenous iron in haemodialysis patients on maintenance erythropoietin. Nephrol. Dial. Transplant. 2001, 16, 1416-1423.

162. Tetta C., Biasioli S., Schiavon R., Inguaggiato P., David S., Panichi V., Wratten M.L.: An overview of haemodialysis and oxidant stress. Blood Purif. 1999, 17, 118-116.
163. Tovbin D., Markowitz A., Mostoslavsky M., Landver R.: Effectiveness of erythropoiesis on supervised intradialytic oral iron and vitamin C therapy is correlated with Kt/V and patient weight. Clin. Nephrol. 2000, 53, 276-282.
164. Trapp G.A.: Plasma aluminum is bound to transferrin. Life Sci. 1083, 33, 311-316.
165. Trinchieri A., Ostini F., Nespoli R., Rovera F. Zanetti G., Pisani E.: Hyperoxaluria in patients with idiopathic calcium nephrolithiasis. J. Nephrol. 1998, 11, 70-72.
166. Venn B.J., Green T.J., Moser R., Mann J.I: Comparison of the effect of low-dose supplementation with L-5-methyltetrahydrofolate or folic acid on plasma homocysteine: a randomized placebo-controlled study. Am. J. Clin. Nutr. 2003, 77, 658-662.
167. Wang A.Y., Sea M. M., Ricky I. R., Law M. C., Chow K. M., Lui S. F., Li P.K., Woo J.: Independent effects of residual renal function and dialysis adequacy on dietary micronutrient intakes in patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. Am. J. Clin. Nutr. 2002, 76, 569-576.
168. Wang S., Eide T. C., Sogan K., Berg K.J., Sund R.B.: Plasma ascorbic acid in patients undergoing chronic haemodialysis. Eur. J. Clin. Pharmacol. 1999, 55, 527-532.
169. Weiss G.: Iron and anemia of chronic disease. Kidney Int. 1999, 55, 12-17.
170. Weiss L.G., Clone N., Fihlho J.D., Frisenette-Fich C., Kurkus J., Svensson B.: The efficacy of once weekly compared with two or three times weekly subcutaneous epoetin β: results from a randomized controlled multicentre trial. Nephrol. Dial. Transplant. 2000, 15, 2014-2019.
171. Więcek A., Myśliwiec M., Smoleński O.: Patogeneza niedokrwistości w przewlekłej niewydolności nerek.(W:) Erytropoetyna od odkrycia do zastosowań klinicznych. Pod red. B. Rutkowskiego. MAKmed wyd. I Gdańsk 2001. S. 67-73.
172. Wienberg E.D.: Iron therapy and cancer. Kidney Int. 1999, 55, 131–134.
173. Wilkinson I.B., Megson I.L., MacCallum H., Sogo N., Cockcroft J.R., Webb D.J.: Oral vitamin C reduces arterial stiffness and platelet aggregation in humans. J. Cardiovasc. Pharmacol. 1999, 34, 690-693.

174. Will J.C., Ford E.S., Bowman B.A.: Serum vitamin C concentrations and diabetes: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. Am. J. Clin. Nutr. 1999, 70, 49-52.
175. Williams M.J.A., Sutherland W.H.F., McCormick M.P., Jong S.A., McDonald J.R., Walker R.J.: Vitamin C improves endothelial dysfunction in renal allograft recipients. Nephrol. Dial. Transplant. 2001, 16, 1251-1255.
176. Wolff F.A., Berend K., Van der Voet G.B.: Subacute fatal aluminum poisoning in dialyzed patients: post-mortem toxicological findings. Foren. Sci. Internat. 2002, 128, 41-43.
177. Woodside J.V., Yarnell J. W.G., McMaster D., Young I.S., Harmon D.L., McCrum E.E., Patterson C.C., Grey K.F., Whitehead A.S., Evans A.: Effect of B-group vitamins and antioxidant vitamins on hyperhomocysteinemia: a double-blind, randomized, factorial-design, controlled trail. Am. J. Clin. Nutr. 1998, 67, 858-866.
178. Working Party for European Best Practise Guidlines for the Management of Anaemia in Patients with Chronic Renal Failure. European best practise guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure. Nephrol. Dial.Transplant. 1999, 14, 1-50.
179. Wratten M.L., Navino C., Tetta C., Verzetti G.: Haemolipodialysis. Blood Purif. 1999, 17, 127-133.
180. Wystrychowski A.: Leczenie niedokrwistości u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek przed leczeniem nerkozastępczym – uwagi praktyczne. (W:) Niedokrwistość u chorych z przewlekłą niewydolnośćią nerek przed rozpoczęciem leczenia nerkozastępczego. Pod red. F. Kokota, E. Franka, Medical Press wyd. I Gdańsk. 2003, 28-38.
181. Wystrychowski A., Więcek A.: Niedokrwistość u chorych a przewlekłą niewydolnością nerek przed leczeniem nerkozastępczego – objawy i skutki. (W:) Niedokrwistość u chorych z przewlekłą niewydolnośćią nerek przed rozpoczęciem leczenia nerkozastępczego. Pod red. F. Kokota, E. Franka, Medical Press wyd. I Gdańsk. 2003, 21-27.
182. Zachwieja K., Kolanowska H., Pietrzyk J.A., Drożdż D., Dyras P., Stec Z., Sancewicz-Pach K.: Stężenie homocysteiny, witaminy B12, kwasu foliowego oraz wybranych parametrów układu krzepnięcia u dzieci ze schyłkową niewydolnością nerek. Nefrol. Dial. Pol. 2001, 5, 198-204.

183. Zajączkowska M., Szanjer-Milart I., Borzecka H., Zinkiewicz Z., Wawrzyszuk M.: Reakcje wolnorodnikowe w glomerulopatiach u dzieci. Nefrol. Dial. Pol. 1999, 3, 229-232.
184. Ziółko M., Pietrzyk J.A., Komorowska M.: Kinetyczne modele hemodializy. Nefrol. Dial. Pol. 1997, 1, 145-151.
185. Zmonarski S.C., Klinger M., Puziewicz-Zmonarska A.: Aktywacja limfocytów CD4+ w czasie pierwszej godziny hemodializy - wpływ rodzaju błony dializacyjnej i leczenia erytropoetyną. Nefrol. Dial. Pol. 2001, 5, 113-115.

9. STRESZCZENIE

Chorzy dializowani to złożona populacja, utrzymywana przy życiu dzięki współczesnej wiedzy medycznej i technice. Problemy łączące się z przewlekłym leczeniem

powtarzaną hemodializą wynikają z jednej strony z niedoskonałości tej terapii w obecnej, powszechnie zaakceptowanej formie (3 zabiegi tygodniowo; trwające od 4 do 5 godzin każdy) jak i ze skutków ubocznych samej dializy oraz nieskutecznie wyrównanej mocznicy.

Zagadnienie gospodarki witaminą C u chorych dializowanych należą do tych, o których wiele pisano, niemniej wiele problemów z nią zawiązanych nadal nie doczekało się satysfakcjonującego wytłumaczenia.

Chorzy ze SNN wymagający dializoterapii (np. hemodializy) są podatni na wystąpienie niedoboru kwasu askorbinowego. Przyczyną niedoboru może być zarówno jego utrata w trakcie trwania dializy **(**spowodowana swobodnym przechodzeniem witaminy C przez błonę dializacyjną do dializatu**)**, jak i ograniczenie podaży w produktach spożywczych**,** wynikające ze stosowania diety z ograniczeniem owoców i warzyw, aby zapobiec hiperkaliemii. Jednocześnie produkty te stanowią najważniejsze źródło witaminy C.

Utrata witaminy C, zwłaszcza w powiązaniu z niedostateczną podażą, może prowadzić do obniżenia jej stężenia w osoczu. To z kolei może prowadzić do jawnego lub subklinicznego jej niedoboru.

Witamina C jest nie tylko istotnym mikroskładnikiem niezbędnym dla prawidłowych czynności metabolicznych ustroju, ale jest także jednym z elementów składowych fizjologicznej bariery antyoksydacyjnej oraz ważnym elementem wpływającym na gospodarkę żelazem. Chorzy hemodializowani muszą mieć zapewnioną wystarczającą ilość żelaza, aby mogli właściwie odpowiedzieć na leczenie ludzką rekombinowaną erytropoetynę (rHuEPO). Niektórzy chorzy mimo dużych zapasów żelaza wykazują zmniejszoną odpowiedź na rHuEPO z powodu upośledzonej jego biodostępności. Czynnościowy niedobór żelaza powstaje wtedy, gdy rHuEPO pobudza erytropoezę do tego stopnia, iż zapotrzebowanie na ustrojowe żelazo przekracza ilość związaną i udostępnioną przez transferynę. Optymalnym sposobem leczenia u takich chorych jest suplementacja żelaza. Podstawowym problemem, jaki pozostaje do rozstrzygnięcia jest droga podaży żelaza oraz jego dawka. Wciąż prowadzona dyskusja, czy można leczyć czynnościowy niedobór żelaza u chorych z nadmiernym zapasem żelaza ustrojowego przy pomocy parenetralnej suplementacji (nie prowadząc do wtórnej hemosyderozy lub innych objawów ubocznych) nie pozwoliła na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Jednym z sposobów zmniejszenia oporności na rHuEPO u tych chorych wydaje się być podaż witaminy C.

Niniejsza praca miała na celu:

1. Ocenę stężenia witaminy C w grupie chorych hemodializowanych w porównaniu do grupy referencyjnej osób zdrowych.

2. Ocenę wpływu zabiegu hemodializy na stężenia witaminy C.
3. Ocenę wpływu sezonowości na zmiany stężenia witaminy C u chorych dializowanych oraz grupy referencyjnej osób zdrowych.
4. Dokonanie próby oceny współzależności pomiędzy odpowiedzią na leczenie rHuEPO a stężeniem witaminy C.
5. Ocenę wpływu suplementacji witaminy C u pacjentów z jej niedoborem na hemopoezę.

Do badania w pierwszym etapie zakwalifikowano 112 chorych z przewlekłą niewydolnością nerek, leczonych hemodializami oraz 23 zdrowych, wydolnych nerkowo ochotników. W pierwszej fazie projekt miał na celu określenie stężenia witaminy C występującego w populacji chorych przewlekle hemodializowanych w porównaniu do grupy referencyjnej osób zdrowych. Równocześnie z oceną stężenia witaminy C w surowicy oceniano gospodarkę żelazem, wpływ witaminy C na hemopoezę oraz czynniki mogące powodować oporność na ludzką rekombinowaną erytropoetynę.
W trakcie badania kontrolowano stężenia: mocznika, kreatyniny, białka całkowitego, albuminy, współczynnika KT/V, żelaza, ferrytyny oraz oceniano poziom saturacji transferyny.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono znamiennie niższe stężenia witaminy C (poniżej normy) u grupie chorych hemodializowanych w porównaniu do grupy referencyjnej osób zdrowych. U pacjentów hemodializowanych, mimo zalecanej podaży witaminy C (60 mg/dobę), jej stężenie w surowicy utrzymuje się zawsze poniżej normy, z obserwowanym znaczącym spadkiem jej stężenia w surowicy w okresie wiosennym. Przez cały rok zawartość spożywanej witaminy C w grupie kontrolnej była zgodna z zaleceniami RDA – 60 mg/24 h. W jesieni i w zimie zanotowano zmniejszenie spożycia witaminy C. Można przypuszczać, że w wyniku zmniejszonego spożycia witaminy C i braku jej akumulacji w ustroju w okresie jesienno-zimowym doszło do stopniowego obniżenia stężenia witaminy C w surowicy i spadku stężenia poniżej normy w okresie wiosennym. Obserwacje poczynione w niniejszej pracy potwierdzają istniejącą tendencję do podwyższenia RDA dla witaminy C do wartości 100 – 120 mg/dobę dla zdrowych niepalących osób, co prowadziło do normalizacji stężeń w okresie wiosennym, a więc - całorocznej stabilizacji stężenia witaminy C w surowicy. W obu badanych grupach stężenie witaminy C wykazuje sezonowość.
W przeprowadzonych podczas jednorocznej obserwacji badaniach wykazano istotne statystycznie niższe ($p < 0,05$) stężenie witaminy C u chorych dializowanych w porównaniu

do grupy kontrolnej na początku obserwacji oraz po 3, 6 i 9 miesiącach. Uzyskiwane wartości w grupie chorych hemodializowanych były poniżej zakresu normy. Stwierdzono, że podczas zabiegu hemodializy stężenie witaminy C w surowicy chorych hemodializowanych obniża się o około 45 %.

Nie stwierdzono znamiennych statystycznie różnic w stężeniu witaminy C pomiędzy niepalącymi i palącymi, pomiędzy mężczyznami i kobietami w całej badanej populacji oraz u chorych dializowanych. Nie obserwowano również różnic w zależności od czasu dializy (powyżej i poniżej 2 lat). **N**ie stwierdzono znamiennej różnicy pomiędzy spadkiem stężenia witaminy C podczas zabiegu hemodializy a ultrafiltracją, Kt/V oraz redukcją stężenia kreatyniny. Nie stwierdzono również istotnego związku pomiędzy przeddializacyjnym stężeniem witaminy C a saturacją transferyny, stężeniem iPTH oraz stężeniem albuminy i ferrytyny.

W analizie danych z ankiet dietetycznych porównywano wyniki uzyskane u 30 chorych dializowanych i 20 ochotników z grupy kontrolnej.

W przeprowadzonych testach nieparametrycznych wykazano znamienne statystycznie różnice w spożyciu pomiędzy chorymi dializowanymi i grupą kontrolną ($p < 0,01$) w zakresie: witaminy C w kwartale II (lato), potasu w kwartale III (jesień) (wyższe u chorych dializowanych!).

W drugim roku badania 68 chorych zakwalifikowano do wdrożenia suplementacji witaminy C. Badano stężenia witaminy C bezpośrednio przed rozpoczęciem cyklu podaży, bezpośrednio po zakończeniu 8 tygodniowego okresu suplementacji oraz po 8 tygodniach przerwy w cyklu suplementacji.

Po okresie suplementacji stężenie witaminy C w badanej populacji wzrosło znamiennie statystycznie ($p < 0,00002$), aby po ośmiu tygodniach powrócić do wartości zbliżonych do wyjściowych.

Nie stwierdzono znamiennej statystycznie korelacji pomiędzy wzrostem stężenia witaminy C po suplementacji a średnim stężeniem iPTH, stężeniem glinu i średnią wartością Kt/V w badanym okresie. Stwierdzono natomiast znamienną, ujemną korelację pomiędzy przyrostem stężenia witaminy C a stopniem wydializowania kreatyniny (ct/c0).

W przeprowadzonych testach nieparametrycznych stwierdzono istotny statystycznie wzrost ($p < 0,00001$) stężenia hemoglobiny i hematokrytu oraz istotny statystycznie różnice ($p < 0,00001$) w dawkowaniu erytropoetyny w okresie suplementacji i 2 oraz 4 miesiące po jej zakończeniu. Stężenia ferrytyny nie zmieniły się istotnie podczas suplementacji oraz w 2 i 4 miesiące po jej zakończeniu. Stwierdzono natomiast istotny statystycznie wzrost ($p < 0,05$)

saturacji transferyny i osoczowego stężenia żelaza po okresie suplementacji oraz w 2 i 4 miesiące po jej zakończeniu przy jednocześnie znamiennie ($p < 0,05$) zmniejszonym jego dawkowaniu. Po okresie suplementacji witaminy C oraz 2 i 4 miesiące później stwierdzono zmniejszenie dawkowania rHuEPO z 3000 j./tydz/pacjenta do 2000 j./tydz./pacjenta.
Suplementacja witaminy C podczas HD ułatwiała uwalnianie zmagazynowanego żelaza i poprawiała odpowiedź na leczenie erytropoetyną.

W obecnej pracy zaobserwowano pozytywny wpływ podaży witaminy C na przełamanie oporności na rHuEPO u pacjentów z toksycznym stężeniem glinu w surowicy (stężenie Al powyżej 50 μg/l). Niestety, analogicznej odpowiedzi nie obserwowano u pacjentów ze stężeniem Al poniżej 50 μg/l oraz z nieprawidłowym stężeniem iPTH (powyżej 800 pg/ml). Ze względu na opisywany niekorzystny wpływ wysokich stężeń witaminy C, przy jej podaży chorym hemodializowanych, stężenie leku w surowicy winno być monitorowane.

ABSTRACT

Hemodialysis patients are a complicated population kept alive thanks to modern medical knowledge and technology. Problems associated with long-term maintenance therapy of repeated hemodialysis are a result of present method imperfections (3 times a week, duration of each session from 4 to 5 hours) and on the other hand – from side effects of the dialysis procedure itself and the unsuccessful leveling of uremia.

The issues concerning vitamin C balance in hemodialysis patients belong to those of which much has been written, but not much headway has been achieved. Solving these problems and satisfactory explanations are yet to found.

Chronic renal insufficient patients, requiring dialysis therapy (hemodialysis) are prone to vitamin C deficiency. This deficiency may be caused by either vitamin C loss during hemodialysis (due to free movement through dialysis membranes into dialysate) and limited intake of fruits and vegetables due to restricted diet that these patients must adhere to in order to avoid hyperkaliemia. However, these food products are main sources of vitamin C.

Vitamin C loss, especially connected with insufficient intake may lead to its decreased serum concentration; this in turn may lead to subclinical or evident vitamin C deficiency.

As an essential micro-constituent required for proper metabolic functions, vitamin C is also one of the physiological components of the antioxidant barrier and an important factor in influencing iron balance and metabolism. Hemodialysis patients require sufficient available iron in order for optimal response to erythropoietin (rHuEPO). Certain patients even though they are iron-overloaded, exhibit rHuEPO hyporesponsiveness due to decreased iron bioavailability. Functional iron deficiency occurs when iron supply is insufficient to meet the demands of increased rHuEPO erythropoiesis. In this state, the need for structural iron exceeds the amount available from transferrin. Iron supplementation is optimal therapy in such patients. Route of iron administration and its dosage becomes a main problem. Presently, iron supplementation has become a topic for discussion and whether this treatment is justified for hyporesponsiveness in patients with iron overload (not leading to secondary hemosiderosis or other side effects). Adjuvant vitamin C administration appears to be a promising therapy in decreasing rHuEPO hyporesponsiveness in hemodialysis patients.

The following aims of this research study were to:

1. Evaluate vitamin C concentrations in the group of hemodialysis patients in comparison to the reference healthy group.
2. Evaluate the effect of hemodialysis procedure on serum vitamin C concentrations.
3. Evaluate seasonal influences on changes of vitamin C concentrations in the hemodialysis patient group and in the healthy reference group.
4. Evaluate correlation between rHuEPO treatment response and vitamin C concentrations.
5. Evaluate vitamin C administration in deficient hemodialysis patients and its effect on hemopoesis.

During the first stage of the study, 112 hemodialysis patients and 23 healthy control subjects were qualified. The aim of the first stage was to measure concentration of vitamin C in hemodialysis population in comparison to the healthy study group. At the same time as vitamin C concentrations were being evaluated – iron homeostasis parameters, blood morphology and factors responsible for resistance to erythropoietin therapy in the hemodialysis patient group were also monitored. During this period, the following concentrations were measured: urea, creatinine, Kt/V value, iron, iPTH, albumin, ferritin and level of transferrin saturation.

During this one-year study period, observed were significant low concentrations of vitamin C in the hemodialysis patient group in comparison to the control group. Hemodialysis patients achieved the RDA for vitamin C (60 mg/day); however, serum vitamin C concentrations were always below normal range, with a substantial drop in serum concentration during the spring season. The healthy control group attained the RDA for vitamin C during the entire study period (60 mg/day). During the autumn and winter seasons, noted was decreased vitamin C intake. One can suspect that due to decreased vitamin C intake at this time and lack of tissue accumulation – this led to a gradual decrease of serum vitamin C concentration and a further drop below normal range in the spring. Observations during this research project uphold the proposal of other authors that have recommended that the RDA for vitamin C be increased to values of 100 – 120 mg/day for healthy, non-smoking adults. In this manner, vitamin C serum concentrations would be normalized during the spring season and later lead to all year round stabilization of serum vitamin C concentration. In both study groups, vitamin C concentrations present seasonal changes.

During this one-year study period, observed was a statistically significant ($p < 0,05$) decrease of vitamin C concentration between hemodialysed patients and control group at the beginning of the study period, 3, 6 and 9 months later. The obtained results in hemodialysed patients

were below reference ranges. During HD, serum concentration of vitamin C decreased about 45 %. No statistically significant differences were found between smokers and non-smokers, females and males of the entire study population and in the hemodialysis population. No differences were noted in vitamin C concentration levels depending on dialysis therapy duration (above and below 2 years). No significant differences were found between vitamin C concentration decreases during dialytic ultrafiltration and Kt/V, nor creatinine concentration decrease. No correlations were presented between pre-dialysis concentrations of vitamin C and transferrin saturation, iPTH, albumin and ferritin concentrations.

Diet questionnaires obtained from 30 dialysed patients and 20 control subjects were evaluated and results were compared.

Non-parametric statistical tests revealed higher vitamin C consumption during the second quarter (summer) and higher potassium consumption in the third quarter (autumn) in the hemodialysed patient group.

During the second stage of the study, 68 hemodialysis patients were qualified for vitamin C supplementation. Vitamin C concentration levels were measured before supplementation, after the 8th week of supplementation and after an 8 week break in vitamin C administration.

After the supplementation period, vitamin C concentration levels significantly increased statistically, returning to similar baseline values during the next 2 months.

No statistically significant correlations were found between the rise of vitamin C concentration level after supplementation and mean concentration of iPTH, aluminum and mean Kt/V value during the study period. However, statistically significant negative correlation was observed between the increase in vitamin C concentration and the degree of creatinine removal during hemodialysis (ct/co).

Non-parametric tests showed statistically significant increase ($p < 0,00001$) of hemoglobin concentration and hematocrit value and statistically significant differences ($p < 0,00001$) in erythropoietin doses during the supplementation cycle, 2 and 4 months after its termination. Ferritin concentration did not change during the supplementation cycle and in 2 and 4 months after its termination. Statistically significant increase ($p < 0,05$) was observed in transferrin saturation and serum iron level immediately after the supplementation cycle, 2 and 4 months after termination, revealing significant decrease of intravenous iron dosage. Dosage of rHuEPO decreased from 3000 U/week/patient to 2000 U/week/patient after the vitamin C supplementation cycle, 2 and 4 months after its termination.

Supplementation of vitamin C during HD facilitated mobilization of iron from inert tissue stores and improved effectiveness of rHuEPO treatment response.

In the present study observed was a positive influence of vitamin C supplementation on breaking through rHuEPO hyporesponsiveness in patients with toxic serum aluminum concentrations (Al > 50 μg/l). However, an analogical influence was not observed in hemodialysis patients with non-toxic aluminum serum concentrations (Al < 50 μg/l) and with abnormal iPTH serum concentrations (iPTH > 800 pg/ml). Due to data concerning negative consequences of high vitamin C concentrations, one must monitor its serum concentrations in hemodialysed patients during supplementation.