

Wpływ reutilizacji dializatorów kwasem nadoctowym na stopień biozgodności wybranych błon dializacyjnych

Każdej sesji hemodializy (HD) towarzyszy pobudzenie układu immunologicznego chorego, będącego odpowiedzią na bezpośredni kontakt krwi pacjenta z błoną dializacyjną szczególnie o niskim stopniu biozgodności. Reakcja ta przybiera głównie postać pobudzenia komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) i sekrecji licznych cytokin. Aktualnie, uważa się, że biozgodność błon dializacyjnych jest jednym z zasadniczych czynników decydujących o adekwatności i bezpieczeństwie HD. Celem pracy było: Ocena i porównanie biozgodności błon kuprofanowych (KUP) i polisulfonowych (PS) nowych i poddawanych reutilizacji za pomocą kwasu nadoctowego w oparciu o oznaczenia IL-6 oraz TNF α w surowicy pacjenta oraz korelacja nanostruktury błony dializacyjnej ze stężeniami markerów biozgodności. Pomiarów szorstkości powierzchni (wyrażonej jako RMS) dokonano techniką mikroskopii sił atomowych (AFM) badając nowe dializatory oraz po kolejnych reutilizacjach (po 1, 2, 3, 4 i 5 – reutilizacji dla KUP oraz po 1, 3, 5, 7 i 10 – reutilizacji dla PS) [23]. Uzyskane wyniki skorelowano z wartościami stężeń IL-6 i TNF α oznaczanych w surowicy chorych w trakcie każdej sesji HD (IL-6 oznaczano w czasie: t_0 i t_{120} ; TNF α : t_0 i t_{90}). Wyniki: Monitorowany przyrost IL-6 w trakcie dializy na nowym oraz reutilizowanym KUP był znamienno statystycznie ($p < 0,048$) dla każdego użycia dializatora, w przypadku PS – przyrost stężeń IL-6 nie osiągnął znamienności statystycznej w żadnym przypadku użycia dializatora. Analogiczny przyrost TNF α dla KUP i PS – nie osiągnął znamienności statystycznej w żadnej krotności użycia badanych dializatorów. Wnioski: Reutilizacja badanych dializatorów kwasem nadoctowym nie poprawia stopnia ich biozgodności ocenianej metodą monitorowania stężeń IL-6 i TNF α . W niniejszym badaniu nie stwierdzono korelacji pomiędzy szorstkością powierzchni badanych błon (RMS) a ich biozgodnością (IL-6 i TNF α). (NEFROL. DIAL. POL. 2007, 11, 106-111)

Evaluation of dialysers reprocessing techniques with peracetic acid on dialysis membranes' biocompatibility

Each hemodialysis session is accompanied by a patients' immunological system activation which is a response to direct blood contact with dialysis membranes especially of low grade biocompatibility. The response mainly presents as peripheral blood mononuclear cells (PBMC) activation and secretion of many cytokines. Nowadays, biocompatibility of dialysis membranes is considered to be one of the major and decisive factors determining HD safety and adequacy. The aim of the study was assessment and comparison of biocompatibility degree of the studied new and reused with peracetic acid dialysis membranes [cuprophane (CUP) and polysulfone (PS)] by monitoring IL-6 and TNF α concentrations in patients' serum and correlation of surface nanostructure (RMS) of given dialysis membranes with biocompatibility markers' concentrations. The dialysis membranes' surface roughness measurements expressed as RMS were accomplished with atomic force microscopy (AFM) technique – using new dialyzers and after consecutive (1, 2, 3, 4, 5th for CUP and after 1, 3, 5, 7, 10th for PS) dialyser use numbers [23]. The collected results then were correlated with the values of IL-6 and TNF α which were determined in patients' serum during each HD session (IL-6 concentrations were determined in t_0 and t_{120} ; TNF α : in t_0 and t_{90}). Results: The increase of IL-6 concentrations during HD on new and reused CUP dialyzer was statistically significant ($p < 0.048$) in each HD session; however in case of PS – the analogous increase of IL-6 did not reach the statistical significance in either HD session. The analogous increase of TNF α concentration during HD performed with new and reused CUP and PS dialyzers was statistically significant in neither HD session. Conclusions: Reuse of studied dialysis membranes with peracetic acid has no positive influence on their biocompatibility degree determined by monitoring IL-6 and TNF α concentrations. No correlation between the dialysis membranes' surface roughness (RMS) and their biocompatibility degree (IL-6 and TNF α) has been found in this study. (NEPHROL. DIAL. POL. 2007, 11, 106-111)

Monika MIKLASZEWSKA¹

Jacek A. PIETRZYK¹

Władysław SUŁOWICZ²

Przemysław KOROHODA³

Roman RUMIAN³

Marek SZYMOŃSKI⁴

Lidia KRAWENTEK³

¹Oddział Dializ Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie
Kierownik: Dr hab. med. Jacek A. Pietrzyk

²Katedra i Klinika Nefrologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie;
Kierownik: Prof. dr hab. med. Władysław Sułowicz

³Katedra Elektroniki AGH w Krakowie
Kierownik: Prof. dr hab. Lidia Maksymowicz

⁴Instytut Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
Kierownik: Prof. dr hab. Marek Szymoński

Key words:

- reutilizacja dializatorów
- biozgodność
- błona dializacyjna

Słowa kluczowe:

- dialyzer reuse
- biocompatibility
- dialysis membrane

*Praca zrealizowana w ramach grantu
KBN nr 3 T11E 023 27*

Adres do korespondencji:
Dr med. Monika Miklaszewska
Oddział Dializ USD
30-663 Kraków, ul. Wielicka 265

Utrzymanie homeostazy ustroju przez nerki jest procesem niezwykle złożonym. Zastąpienie w pełni czynności własnych nerek poprzez hemodializę (HD) nie jest w chwili obecnej możliwe z wielu powodów. Jednym z nich jest niedoskonałość błony dializacyjnej odgrywającej najważniejszą rolę w całokształcie procesu oczyszczania i odwadniania. Rodzaj zastosowanej błony dializacyjnej jest bezspornie jednym z najistotniejszych elementów decydującym o skuteczności, bezpieczeństwie oraz adekwatności zabiegu hemodializy, który pozostaje dominującą formą terapii nerkozastępczej zarówno w Polsce jak i w innych rozwiniętych krajach świata. Tą metodą na koniec 2005 roku w naszym kraju leczono 12166 pacjentów czyli 92,9% wszystkich chorych ze schyłkową niewydolnością nerek (SNN) [31].

Współcześnie, kiedy udało się osiągnąć zadowalające krótkoterminowe efekty hemodializoterapii - zaczęto zwracać uwagę na odległe i długoterminowe skutki tej formy leczenia. Aktualnie celem terapii nerkozastępczej (w tym hemodializoterapii) jest zapewnienie chorym ze SNN jak najlepszej jakości życia oraz zmniejszenie wciąż bardzo wysokiej chorobowości i śmiertelności wynoszącej w populacji chorych dializowanych blisko 20% rocznie [5].

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

Poważną przeszkodą na drodze poprawy skuteczności hemodializy pozostaje nadal niedoskonała w swej strukturze oraz funkcji błona półprzepuszczalna a także bardzo wysoki koszt tej formy terapii. Problematyce wielokrotnego użycia dializatorów jako metodzie obniżającej koszty leczenia nerkozastępczego – poświęcono wiele artykułów oraz rozdziałów w podręcznikach. Jeszcze do niedawna panował pogląd, że wielokrotne użycie dializatora nie powoduje żadnych negatywnych skutków, redukuje koszty leczenia – a dodatkowo poprzez poprawę biozgodności błon o wyższości niskim jej stopniu – może przynieść korzyści samym dializowanym pacjentom [41,42]. W świetle współczesnej wiedzy, wydaje się, że do pełnej oceny biozgodności błon dializacyjnych powinno się stosować metody równoczesnej oceny zarówno charakterystyki samej błony dializacyjnej jak i odpowiedzi pacjenta na kontakt z dializatorem. W związku z powyższym, badania nanostruktury kapilar techniką AFM zostały w niniejszej pracy poszerzone o ocenę i porównanie stopnia biozgodności błon polisulfonowych (PS) i kuprofanowych (KUP) nowych i poddawanych wielokrotnej reutilizacji kwasem nadocytowym – metodą monitorowania zmian stężeń IL-6 oraz TNF α w surowicy pacjentów. Ponadto, podjęto próbę korelacji struktury błony dializacyjnej w skali nanometrów z wartościami stężeń badanych markerów biozgodności.

Cel pracy:

1. Ocena i porównanie biozgodności

błon kuprofanowych i polisulfonowych nowych i poddawanych wielokrotnej reutilizacji za pomocą oznaczania markerów biozgodności: IL-6 oraz TNF α .

2. Próba korelacji struktury błony dializacyjnej w skali nanometrów ze stężeniem markerów biozgodności: IL-6 oraz TNF α .

Materiał i metody

I. Część kliniczna pracy

Charakterystykę pacjentów, rodzaj stosowanych dializatorów, metodykę ich reutilizacji, metodologię badania nanostruktury powierzchni błon dializacyjnych oraz uzyskane wyniki – szczegółowo opisano w poprzedniej pracy [23].

II. Część pomiarowa pracy

1. Metodologia oceny biozgodności badanych błon dializacyjnych

Oceny stopnia biozgodności błon kuprofanowych i polisulfonowych dokonano poprzez monitorowanie stężeń interleukiny 6 (IL-6) oraz czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF α) w surowicy chorych w czasie sesji hemodializ, wykorzystując w tym celu dializatory nowe oraz po kolejnych reutilizacjach kwasem nadocytowym (po 1, 2, 3, 4 i 5 – reutilizacji dla KUP oraz po 1, 3, 5, 7 i 10 – reutilizacji dla PS).

W eksperymentalnym badaniu przeprowadzonym w warunkach *in vivo*, w którym oceniano kinetykę procesu wydzielania cytokin po zadziałaniu na organizm ludzki bakteryjnym lipopolisachrydem (LPS) – stwierdzono, że maksymalne stężenie IL-6 zostaje osiągnięte w 120. minucie, natomiast maksymalne stężenie TNF α – stwierdzono pomiędzy 60 a 90 minutą od momentu podania pacjentowi tej substancji [32,45].

Od pacjentów pobierano około 1,5 ml krwi (w celu oznaczenia zarówno stężeń TNF α i IL-6) przed rozpoczęciem sesji HD a następnie taką samą ilość krwi pobierano po 90 minutach w celu oznaczenia stężenia TNF α i po 120 minutach w celu oznaczenia stężenia IL-6 – krew pobierano przed dializatorem.

Stężenia IL-6 oznaczano metodą immunoradiometryczną (IRMA), przy użyciu gotowego zestawu Interleukin-6-IRMA (Immunoradiometric Assay) [3]. Pomiarów radioaktywności dokonywano w automatycznym liczniku scyntylacyjnym promieniowania gamma Wallac 1470 WIZARD®, firmy PerkinElmer, USA.

Stężenia TNF α oznaczano metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu gotowego zestawu *Tumor Necrosis- α CB ELISA* (TNF α CB) [4]. Pomiarów absorbancji próbek dokonywano metodą jednofalową przy użyciu filtra 650 nm w automatycznym czytniku mikroplatek Universal Microplate Reader Elx800NB firmy BIO-TEK Instruments, INC.

III. Analiza statystyczna uzyskanych

wyników

Wszystkie obliczenia statystyczne zamieszczone w niniejszej pracy wykonano przy wykorzystaniu programu StatsDirect Statistical Software wersja 2.3.8 (numer licencji: m1640s824653 qk18hd52951a).

1. Analiza statystyczna wyników pomiarów szorstkości powierzchni błon dializacyjnych

Wyniki parametrów szorstkości powierzchni dla dwóch badanych grup dializatorów: kuprofanowych i polisulfonowych poddanych analizie te-

stem *t-Studenta* dla małych prób z uwzględnieniem równości wariancji – szczegółowo przedstawiono w poprzedniej pracy [23].

2. Analiza statystyczna wyników oceny biozgodności błon dializacyjnych

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

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

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

Istotność statystyczną różnic w wartościach średnich IL-6 oraz TNF α uzyskanych w czasie t_0 i t_{120} (dla IL-6) oraz w czasie t_0 i t_{90} (dla TNF α) w obydwu grupach pacjentów (dializowanych przy użyciu błon kuprofanowych oraz polisulfonowych) pomiędzy badanymi grupami analizowano testem *t-Studenta* dla grup niezależnych. Za poziom istotności we wszystkich obliczeniach przyjęto $p < 0,05$.

Zgoda Komisji Bioetycznej

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

Wyniki

I. Ocena nanostruktury błon dializacyjnych

1. Parametry szorstkości

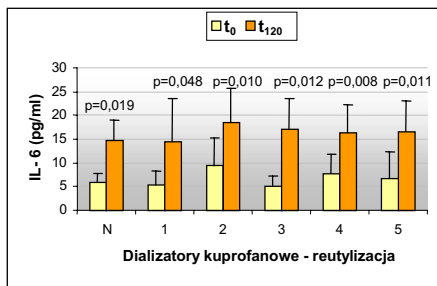
Parametry szorstkości powierzchni wewnętrznej błony polisulfonowej wskazują na większą szorstkość tej powierzchni w porównaniu do powierzchni wewnętrznej błony kuprofanowej. Wartości parametrów szorstkości powierzchni zewnętrznej błon kuprofanowych i polisulfonowych wskazują na znacznie większą szorstkość (czyli porowatość) błony polisulfonowej w porównaniu do błony kuprofanowej. Szczegółowe wyniki oceny nanostruktury błon dializacyjnych (RMS, BR20%, BR80%) – przedstawiono w poprzedniej pracy [23].

II. Wyniki badania biozgodności błon dializacyjnych

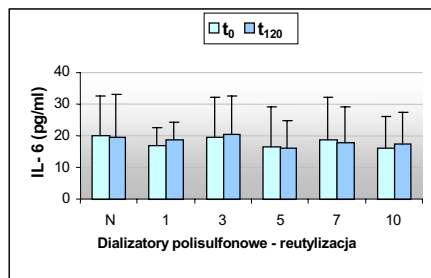
1. Interleukina 6 (IL-6)

Przyrost IL-6 w trakcie dializy na nowym oraz 1, 2, 3, 4, 5-krotnie reutilizowanym dializatorze kuprofanowym okazał się znamienno statystycznie ($p < 0,048$) dla każdego użycia dializatora. Reutilizacja kwasem nadocytowym dializatorów kuprofanowych nie wpływa na poprawę stopnia ich biozgodności (rycina 1).

Natomiast przyrost stężeń IL-6 w trakcie dializy na nowym oraz 1, 3, 5, 7, 10-krotnie reutilizowanym dializatorze polisulfono-



Rycina 1
Dializatory kuprofanowe. Zmiany wartości stężeń IL-6 w trakcie dializy na nowym oraz 1, 2, 3, 4, 5-krotnie reużywanym dializatorze.
Cuprophane dialyzers. IL-6 level reminders during HD on new and after consecutive (1, 2, 3, 4, 5) - dialyser reuse numbers.



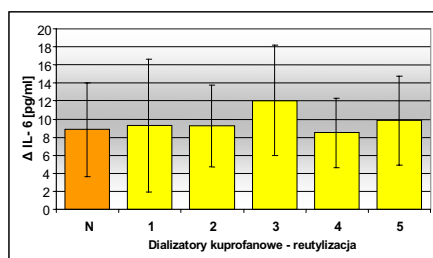
Rycina 2
Dializatory polisulfonowe. Zmiany wartości stężeń IL-6 w trakcie dializy na nowym oraz 1, 3, 5, 7, 10-krotnie reużywanym dializatorze.
Polysulfone dialyzers. IL-6 level reminders during HD on new and after consecutive (1, 3, 5, 7, 10) - dialyser reuse numbers.

wym nie osiągnął znamienności statystycznej w żadnym przypadku użycia dializatora. Reużywanie kwasem nadctowym dializatorów polisulfonowych nie ma wpływu na ich wysoki stopień biogodności (rycina 2).

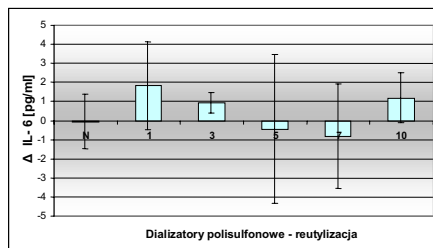
Przyrosty stężeń IL-6 po kolejnych reużyowaniach błony kuprofanowej oraz polisulfonowej w porównaniu do zmiany stężenia IL-6 odnotowanego dla nowych błon – nie osiągnęły istotności statystycznej po żadnej krotności reużywania tych dializatorów. Nie uzyskano oczekiwanej poprawy stopnia biogodności błon kuprofanowych poddawanych procesowi reużywania kwasem nadctowym. Reużywanie dializatorów kuprofanowych kwasem nadctowym nie wpłynęła w sposób istotny na zmianę stopnia ich biogodności ocenianej metodą monitorowania stężeń IL-6. W przypadku dializatorów polisulfonowych reużywanie kwasem nadctowym również nie wpłynęła w sposób istotny na zmianę stopnia ich biogodności, ocenianej metodą monitorowania stężeń IL-6 (rycina 3, 4).

Średnia wartość IL-6 w grupie kontrolnej wynosiła 4,9 pg/ml, natomiast średnia wartość IL-6 w okresie przed rozpoczęciem HD (w czasie t_0) u wszystkich 10 pacjentów poddanych badaniu była 2,5-krotnie większa – wynosiła bowiem 12,3 pg/ml. W drugiej godzinie po rozpoczęciu zabiegu HD (w czasie t_{120}) średnia wartość

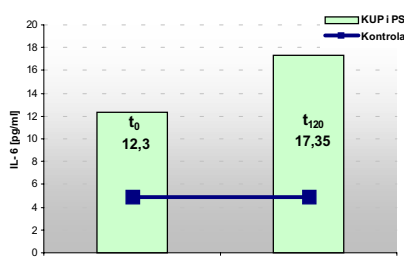
IL-6 u wszystkich 10 pacjentów poddanych badaniu wynosiła 17,35 pg/ml – zatem była ponad 3,5-krotnie większa w porównaniu do grupy kontrolnej (rycina 5).



Rycina 3
Dializatory kuprofanowe. Istotność statystyczna zmian stężeń IL-6 (IL-6) po kolejnych reużyowaniach dializatora w porównaniu do IL-6 dla nowej błony.
Cuprophane dialyzers. Statistical significance of IL-6 level reminders (IL-6) after consecutive dialyser reuse comparing to IL-6 for a new membrane.



Rycina 4
Dializatory polisulfonowe. Istotność statystyczna zmian stężeń IL-6 (IL-6) po kolejnych reużyowaniach dializatora w porównaniu do IL-6 dla nowej błony.
Polysulfone dialyzers. Statistical significance of IL-6 level reminders (IL-6) after consecutive dialyser reuse comparing to IL-6 for a new membrane.



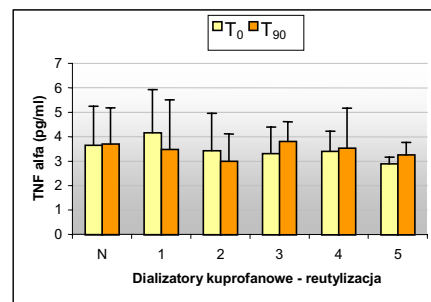
Rycina 5
Zestawienie uśrednionych wartości stężeń IL-6 uzyskanych w obydwu badanych grupach pacjentów ze średnią wartością IL-6 uzyskaną w grupie kontrolnej.
Comparison of mean IL-6 concentrations reached in both studied patients' cohorts with the mean value of IL-6 obtained in control group.

2. Czynniki martwicy nowotworów (TNF α)

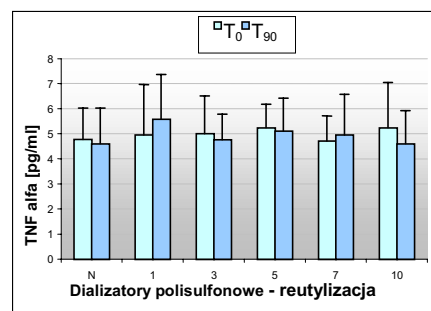
Przyrost TNF α w trakcie dializy na nowym oraz 1, 2, 3, 4, 5-krotnie reużywanym dializatorze kuprofanowym oraz nowym oraz 1, 3, 5, 7, 10-krotnie reużywanym dializatorze polisulfonowym nie osiągnął znamienności statystycznej w żadnej krotności użycia wymienionych dializatorów (rycina 6, 7).

Zmiany stężeń TNF α obserwowane po kolejnych reużyowaniach błony kuprofanowej oraz polisulfonowej w porównaniu do zmiany stężenia TNF α obserwowanego dla nowych błon – nie osiągnęły istotności statystycznej po żadnej krotności reużywania tych dializatorów (rycina 8, 9).

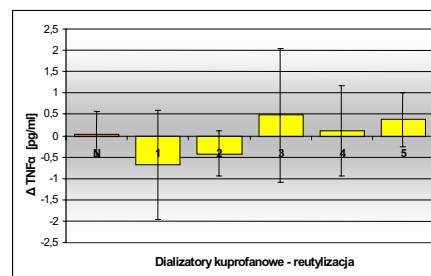
Nie uzyskano oczekiwanej poprawy stopnia biogodności błon kuprofanowych poddawanych reużyowaniu kwasem nadctowym. Reużywanie dializatorów kuprofa-



Rycina 6
Dializatory kuprofanowe. Zmiany wartości stężeń TNF α w trakcie dializy na nowym oraz 1, 2, 3, 4, 5-krotnie reużywanym dializatorze.
Cuprophane dialyzers. TNF α level reminders during HD on new and after consecutive (1, 2, 3, 4, 5) - dialyser reuse numbers.



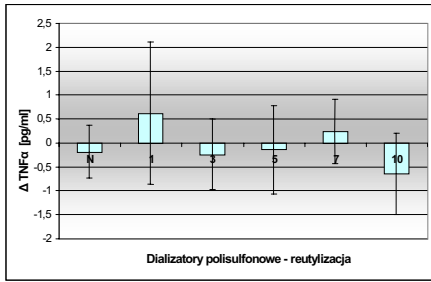
Rycina 7
Dializatory polisulfonowe. Zmiany wartości stężeń TNF α w trakcie dializy na nowym oraz 1, 3, 5, 7, 10-krotnie reużywanym dializatorze.
Polysulfone dialyzers. TNF α level reminders during HD on new and after consecutive (1, 3, 5, 7, 10) - dialyser reuse numbers.



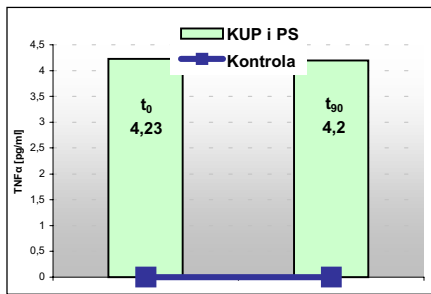
Rycina 8
Dializatory kuprofanowe. Istotność statystyczna zmian stężeń TNF α (Δ TNF α) po kolejnych reużyowaniach dializatora w porównaniu do TNF α dla nowej błony.
Cuprophane dialyzers. Statistical significance of TNF α level reminders (Δ TNF α) after consecutive dialyser reuse comparing to TNF α for a new membrane.

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

Średnia wartość TNF α w grupie kontrolnej wynosiła 0,00 pg/ml, natomiast średnia wartość TNF α w okresie przed rozpoczęciem HD (czas t_0) u wszystkich 10 pacjentów poddanych badaniu była około 4-krotnie większa – wynosiła bowiem 4,23 pg/ml.



Rycina 9
Dializatory polisulfonowe. Istotności statystyczna zmian stężeń $TNF\alpha$ ($\Delta TNF\alpha$) po kolejnych reutilizacjach dializatora w porównaniu do $TNF\alpha$ dla nowej błony.
Polysulfone dialyzers. Statistical significance of $TNF\alpha$ level reminders ($\Delta TNF\alpha$) after consecutive dialyser reuse comparing to $TNF\alpha$ for a new membrane.



Rycina 10
Zestawienie uśrednionych wartości stężeń $TNF\alpha$ uzyskanych w obydwu badanych grupach pacjentów ze średnią wartością $TNF\alpha$ uzyskaną w grupie kontrolnej.
Comparison of averaged $TNF\alpha$ concentrations reached in both studied patients' cohorts with the mean value of $TNF\alpha$ obtained in control group.

Tabela I

Błona kuprofanowa i polisulfonowa. Średnie wartości stężeń IL-6 w czasie T_0 i T_{120} oraz średni przyrost stężenia IL-6 wraz z średnimi wartościami $TNF\alpha$ w czasie T_0 i T_{90} oraz średni przyrost stężenia $TNF\alpha$.

Cuprophane and polysulfone membrane. Mean values of IL-6 concentrations in T_0 , T_{120} and mean increase of IL-6 concentration together with $TNF\alpha$ concentrations in T_0 , T_{90} and mean increase of $TNF\alpha$ concentration.

	Interleukina - 6 (IL-6)				Czynnik martwicy nowotworów alfa ($TNF\alpha$)			
	T_0 średnie	T_{120} średnie	Δ IL-6 średnie	Grupa kontrolna	T_0 średnie	T_{90} średnie	Δ $TNF\alpha$ średnie	Grupa kontrolna
CUP	6,7	16,3	9,6	4,9	3,47	3,46	-0,01	0,0
PS	17,9	18,4	0,5	4,9	4,99	4,94	-0,06	0,0

Błona kuprofanowa	IL-6	RMS powierzchni wewnętrznej	Błona polisulfonowa	IL-6	RMS powierzchni wewnętrznej
Reutilizacja	t	wsp. r	Reutilizacja	t	wsp. r
N	0	-0,09	N	0	-0,85
	120	0,35		120	-0,79
1	0	0,08	1	0	0,36
	120	-0,63		120	0,07
2	0	0,61	3	0	-0,39
	120	0,33		120	-0,41
3	0	-0,82	5	0	-0,20
	120	0,29		120	-0,22
4	0	0,45	7	0	-0,38
	120	0,27		120	-0,30
5	0	<0,01	10	0	0,60
	120	0,25		120	0,68

można stwierdzić brak, lub co najwyżej słaby związek pomiędzy szorstkością powierzchni błony a jej biozgodnością, co – w założeniu pracy – miało być jedną z głównych przyczyn pobudzających reakcje immunologiczne pacjenta [6].

Omówienie wyników

Przewlekła hemodializoterapia stanowi istotny czynnik odpowiedzialny za aktywację procesu zapalnego – a za element odgrywający najistotniejszą rolę w stymulowaniu odpowiedzi immunologicznej uważa się rodzaj zastosowanej błony dializacyjnej. Pod wpływem kontaktu z błonami dializacyjnymi (zwłaszcza wykonanymi z niemodyfikowanej celulozy) dochodzi do zwiększonej ekspresji cząstek adhezyjnych na powierzchni komórek jednójdrzastych krwi obwodowej (PBMC) oraz wydzielania przez te komórki szeregu prozapalnych cytokin (m.in. IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, $TNF\alpha$ i MCP-1) a także licznych czynników wzrostowych [13, 38]. IL-1, $TNF\alpha$ – a przede wszystkim IL-6 – należą do cytokin, które odgrywają kluczową rolę w patogenezie systemowej odpowiedzi zapalnej (SIRS), będącej odpowiedzią ustroju na kontakt z bioniezgodnymi tworzywami [13].

Problem biozgodności błon dializacyjnych dyskutowany jest już od wielu lat. Z uwagi na fakt, że indukcja sekrecji cytokin jest powszechnie zaakceptowanym parametrem oceny stopnia biozgodności różnych typów błon dializacyjnych [13], w niniejszej pracy monitorowano zmiany stężeń niektórych z nich w trakcie rutynowego leczenia powtarzaną hemodializą, używając standardowo reutilizowanych dializatorów.

Wyniki licznych, opublikowanych w ostatnich latach badań [1,7,15,19,22,30,43] dotyczących biozgodności błon dializacyjnych – skłaniają do zadania pytania, która z

Tabela II

Błona kuprofanowa i polisulfonowa. Zestawienie wartości RMS powierzchni wewnętrznej z wartościami stężeń IL-6 po kolejnych reutilizacjach dializatorów.

Cuprophane and polysulfone membrane. Comparison of internal surface RMS values with IL-6 concentrations after consecutive dialysers reuse numbers.

Tabela III

Błona kuprofanowa i polisulfonowa. Zestawienie wartości RMS powierzchni wewnętrznej z wartościami stężeń TNF α po kolejnych reutilizacjach dializatorów.
Cuprophane and polysulfone membrane. Comparison of internal surface RMS values with TNF α concentrations after consecutive dialysers reuse number.

Błona kuprofanowa				Błona polisulfonowa			
Reutilizacja	TNF α	RMS powierzchni wewnętrznej		Reutilizacja	TNF α	RMS powierzchni wewnętrznej	
		wsp. r	istotność			wsp. r	istotność
N	0	-0,175	NS	N	0	0,056	NS
	90	-0,193	NS		90	0,341	NS
1	0	0,855	0,06	1	0	0,187	NS
	90	0,626	NS		90	0,288	NS
2	0	-0,011	NS	3	0	0,324	NS
	90	0,180	NS		90	0,315	NS
3	0	-0,027	NS	5	0	0,009	NS
	90	0,779	0,12		90	-0,111	NS
4	0	-0,621	NS	7	0	0,244	NS
	90	-0,412	NS		90	0,113	NS
5	0	0,355	NS	10	0	-0,366	NS
	90	-0,836	0,08		90	-0,540	NS

cytokin: IL-6 czy TNF α jest bardziej czułym i swoistym markerem stopnia biozgodności dializatorów? Czy też, aby uzyskać pełny obraz stanu immunologicznego pacjenta, należy równolegle monitorować stężenia obydwu tych cytokin?

W surowicy chorych poddawanych hemodializoterapii stężenia IL-6 są znacznie wyższe w porównaniu do wartości stwierdzonych u chorych dializowanych otrzewnowo, u chorych z PNN lecz pozostających jeszcze w okresie przeddializacyjnym a także w populacji ludzi zdrowych [8, 14, 25, 37]. Ponadto analiza regresji wielokrotnej przeprowadzona przez Kaizu i wsp. [18] wykazała, że stężenie IL-6 oceniane przed sesją hemodializy koreluje z czasem leczenia nerkozastępczego, wiekiem chorych oraz tworzywem, z którego wykonano błony dializacyjne (w przypadku błon celulozowych stężenie IL-6 przed sesją HD było znacznie większe aniżeli w przypadku błon syntetycznych).

Średnia wartość IL-6 w grupie kontrolnej w niniejszym badaniu wynosiła 4,9 pg/ml, natomiast średnia wartość IL-6 w okresie przed rozpoczęciem sesji hemodializy u wszystkich 10 pacjentów poddanych badaniu była 2,5-krotnie większa – wynosiła bowiem 12,3 pg/ml. Jednak po upływie 2 godzin od rozpoczęcia zabiegu HD średnia wartość IL-6 u wszystkich 10 pacjentów poddanych badaniu wynosiła 17,35 pg/ml – zatem była ponad 3,5-krotnie większa w porównaniu do grupy kontrolnej. Ma to istotne znaczenie prognostyczne, gdyż wiele danych w piśmiennictwie wskazuje, że wysokie stężenia IL-6 są związane z niekorzystnym odległym rokowaniem tych chorych [28].

Zależność pomiędzy stężeniem IL-6 a wiekiem chorych wykazaną przez Kaizu i wsp. [18] można zauważyć również w niniejszej pracy. W grupie chorych, dializowanych przy użyciu błon kuprofanowych, których średnia wieku stanowiła 18 lat – średnie przeddializacyjne stężenie IL-6 wynosiło 6,7 pg/ml, natomiast w grupie chorych dializo-

wanych przy użyciu błon polisulfonowych, których średnia wieku stanowiła 54,2 lat – średnie przeddializacyjne stężenie IL-6 wynosiło aż 17,9 pg/ml, przy czym różnica ta była istotna statystycznie.

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

Poprawa stopnia biozgodności błon dializacyjnych miała być (obok oczywistych względów ekonomicznych) jednym z głównych i najważniejszych celów reutilizacji dializatorów. Postulowano, że kolejne użycie tej samej błony dializacyjnej jest korzystniejsze dla pacjenta ze względu na ochronne działanie białek osadzających się na wewnętrznej powierzchni błony filtracyjnej [34, 41, 42].

Potwierdzeniem tej tezy są wyniki badań uzyskane przez Pietrzyka i wsp., w których wykorzystując technikę mikroskopu immunofluorescencyjnego udowodniono, że wielokrotne użycie dializatora kuprofanowego – a także polisulfonowego – powoduje osadzanie się na wewnętrznej powierzchni kapilar i we wnętrzu ich ścian depozytu białkowego, składającego się głównie z fibrynogenu, składowej C4 dopełniacza, immunoglobuliny G oraz albuminy [27]. Z drugiej jednak strony wiadomo, że kwas nadocetowy jest środkiem silnie utleniającym, który w trakcie procesu reutilizacji tylko częściowo usuwa białka osadzone na powierzchni błony. Pozostałe proteiny ulegają denaturacji i utlenieniu, co prowadzi do powstania ujemnych ładunków na powierzchni błony [34, 44]. W trakcie kolejnego użycia dializatora zamiast spodziewanej poprawy biozgodności dochodzi nie tylko do intensywnej aktywacji monocytów i gwałtownego wydzielania cytokin (m.in. IL-1 β , IL-6) ale także do aktywacji czynnika Hagemana, wydzielania kalikreiny i innych kinin [20].

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

W świetle doniesień współczesnego piśmiennictwa [7, 15, 30, 43] a także na podstawie własnych wyników uzyskanych w niniejszej pracy, w której przyrost stężeń IL-6 w trakcie dializy na nowym oraz kilkakrotnie reutilizowanym dializatorze kuprofanowym był znamienne statystycznie w każdym przypadku użycia dializatora (przy jednoczesnym braku wyraźnego pobudzenia monocytów w grupie chorych dializowanych na dializatorach polisulfonowych) – stosowanie biozgodnych błon dializacyjnych powinno być priorytetowym zaleceniem w kontekście jak najdłuższego uchronienia chorych przed wystąpieniem licznych, poważnych powikłań związanych z hemodializoterapią a także - zminimalizowania ich skutków. Blisko dwudziestokrotnie większy średni przyrost stężenia IL-6 (9,6 vs 0,5 pg/ml) u chorych dializowanych przy użyciu błon kuprofanowych w porównaniu do błon polisulfonowych świadczy o dużej biozgodności tych pierwszych.

W obecnej pracy nie wykazano znamiennych statystycznie różnic w zakresie wartości stężeń TNF α oznaczanych przed i po 90 minutach trwania sesji HD w żadnej z badanych grup. Przyczyna tego zjawiska być może uwarunkowana zaburzeniem w zakresie wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału zależnego od receptorów Toll – podobnych w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej u dializowanych chorych z PNN [11, 16, 21, 23, 33, 36, 39].

Analizując wyniki uzyskane w niniejszej pracy, w której średnie stężenie IL-6 obliczone dla wszystkich badanych chorych hemodializowanych było prawie 3,5-krotnie wyższe od poziomu tej cytokiny stwierdzonego w grupie kontrolnej, natomiast średnie stężenie TNF α w grupie objętych badaniem pacjentów – przekraczało 4-krotnie stężenie stwierdzone w grupie kontrolnej – a także wyniki przytoczonych powyżej doniesień piśmiennictwa mówiących o stopniu pobudzenia komórek immunokompetentnych przez poszczególne rodzaje błon dializacyjnych – nie należy zapominać o konsekwencjach klinicznych takiej sytuacji.

Sięgając po błonę dializacyjną, która silnie aktywuje odpowiedź immunologiczną ustroju należy mieć świadomość, że wysokie stężenia prozapalnych cytokin (w tym IL-6 i TNF α) przyczyniają się do znacznego pogorszenia rokowania chorych hemodializowanych poprzez negatywny wpływ na utrzymanie resztkowej funkcji nerek, na stan odżywienia białkowo-energetycznego a także na częstość i nasilenie powikłań infekcyjnych [26,35,38].

Pomimo ogromnego postępu, jaki dokonał się w ostatnich latach w dziedzinie dializoterapii, śmiertelność chorych przewlekle dializowanych nadal pozostaje od 4 do 5 razy większa aniżeli w analogicznej wiekowo populacji ogólnej [2]. Cytokiny wydzielane podczas zabiegów hemodializacji są czynnikami o postulowanym negatywnym wpływie na przeżycie i śmiertelność chorych z PNN leczonych nerkozastępczo [9,12,17]. Należy mieć świadomość, że na odległe rokowanie chorych przewlekle dializowanych mają wpływ zarówno dawka dializy jaką zaoferujemy pacjentowi – innymi słowy współczynnik przepuszczalności użytego filtra (*low vs high flux*) a także stopień biozgodności błony dializacyjnej. Obydwa wymienione czynniki mogą działać jako niezależni sprzymierzeńcy człowieka przewlekle dializowanego ale także mogą stać się pośrednią (lecz najistotniejszą) przyczyną zwiększonej chorobowości i śmiertelności w tej populacji chorych.

Na podstawie uzyskanych w niniejszej pracy wyników a także po analizie piśmiennictwa należy przyjąć stanowisko, że reutilizacji nie należy już dłużej traktować jako metody „poprawy biozgodności” błon dializacyjnych z uwagi na coraz szersze zastosowanie wysoce biozgodnych błon syntetycznych oraz istotne zmniejszenie częstości występowania zespołu pierwszego użycia dializatorów [29]. Aczkolwiek w przypadku dializatorów typu *high-flux* reutilizowanych przy pomocy renaliny nie tylko są zachowane doskonale właściwości filtracyjne tych błon lecz również dochodzi do zmniejszenia nasilenia zjawiska tzw. wstecznej ultrafiltracji a co za tym idzie – do zmniejszenia nasilenia stanu zapalnego, co kompleksowo przekłada się na lepsze rokowanie dializowanych pacjentów [40].

Wnioski

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

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

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

Piśmiennictwo

- Amato M., Cozzolino F., Bergesio F. et al.: In vitro interleukin-1 production by different dialysis membranes. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1988, 3, 432.
- Arora P., Strauss B., Borovnicar D. et al.: Total body nitrogen predicts long-term mortality in haemodialysis patients - a single-centre experience. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 1731.
- Biosource International: Interleukin 6 IRMA (IL-6). Diagnostic catalog 2002 - 2003, 98.
- Biosource International: Tumor Necrosis Factor- α CB ELISA (TNF- α CB). Diagnostic catalog 2002 - 2003, 104.
- Bologa R.M., Levine D.M., Parker T.S. et al.: Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, 32, 107.
- Bowry S.K., Ronco C.: Surface topography and surface elemental composition analysis of Helixone $\text{\textcircled{R}}$, a new high-flux polysulfone dialysis membrane. *Int. J. Artif. Org.* 2001, 24, 757.
- Canivet E., Lavaud S., Wong T. et al.: Cuprophane but not synthetic membrane induces increases in serum tumor necrosis factor- α levels during hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis.* 1994, 23, 41.
- Cavaillon J.M., Poinget J.L., Fitting C., Delons S.: Serum interleukin 6 in long term hemodialysed patients. *Nephron* 1992, 60, 307.
- Cross A. S.: Endotoxin tolerance - current concepts in historical perspective. *J. Endotoxin Res.* 2002, 8, 83.
- McGettrick A., O'Neill L.: The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Molec. Immunol.* 2004, 41, 577.
- Gomółka M., Niemczyk S., Paczek L.: Kliniczne następstwa zwiększonej produkcji cytokin u chorych przewlekle hemodializowanych. *Nefrol. Dial. Pol.* 2003, 7, 118.
- Guth H., Gruska S., Kraatz G.: The measurement of cytokine production capacity during dialysis - a new dynamic method for the evaluation of bio-compatibility? *Int. J. Artif. Org.* 2000, 23, 675.
- Herbelin A., Urena P., Nguyen A.T. et al.: Elevated circulating levels of interleukin 6 in patients with chronic renal failure. *Kidney Int.* 1991, 39, 954.
- Hoffmann U., Fischereder M., Marx M. et al.: Induction of cytokines and adhesion molecules in stable hemodialysis patients: Is there an effect of membrane material? *Am. J. Nephrol.* 2003, 23, 442.
- Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T. et al.: Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J. Immunol.* 1999, 162, 3749.
- Ikizler T.A., Wingard R.L., Harvell J. et al.: Association of morbidity with markers of nutrition and inflammation in chronic hemodialysis patients: A prospective study. *Kidney Int.* 1999, 55, 1945.
- Kaizu Y., Kimura M., Yoneyama T. et al.: Interleukin-6 may mediate malnutrition in chronic hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, 31, 93.
- Kino K., Akizawa T., Koshikawa S.: Effects of membrane characteristics on cytokine production by mononuclear cells in regular haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1995, 10(Suppl. 3), 29.
- Klinkmann H., Grassmann A., Vienken J.: Dilemma of membrane biocompatibility and reuse. *Artif. Organs* 1996, 20, 426.
- Li Q., Verma I.M.: NF- κ B regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2002, 2, 725.
- Lonnemann G., Koch K.M., Shaldon S., Dinarello C.A.: Studies on the ability of hemodialysis membranes to induce, bind and clear human interleukin-1. *J. Lab. Clin. Med.* 1988, 112, 76.
- Medzhitov R.: Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews. Immunology* 2001, 1, 135.
- Miklaszewska M., Pietrzyk J.A., Sułowicz W. i wsp.: Wpływ reutilizacji dializatorów kwasem nadoctowym na nanostrukturę powierzchni błon dializacyjnych ocenianej techniką mikroskopii sił atomowych. *Nefrol. Dial. Pol.* 2007, 11,
- Nakahama H., Tanaka Y., Shirai D. et al.: Plasma interleukin 6 levels in continuous ambulatory peritoneal dialysis and hemodialysis patients. *Nephron* 1992, 61, 132.
- Noronha I.L., Fujihara C.K., Zatz R.: The inflammatory component in progressive renal disease - are interventions possible? *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002, 17, 363.
- Nowak S., Pietrzyk J.A., Sułowicz W. i wsp.: Optymalizacja reutilizacji dializatorów. Sprawozdanie projektu badawczego: KBN nr 8T11E 037 12. Kraków 1999.
- Pecoits-Filho R., Barany P., Lindholm B. et al.: Interleukin-6 is an independent predictor of mortality in patients starting dialysis treatment. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002, 17, 1684.
- Robinson B.M., Feldman H.I.: Dialyzer reuse and patient outcome: what do we know? *Semin. Dial.* 2005, 18, 3, 175.
- Rostaing L., Peres C., Tkaczuk J. et al.: Ex vivo flow cytometry determination of intracytoplasmic expression of IL-2, IL-6, IFN- γ , and TNF- α in monocytes and T lymphocytes, in chronic hemodialysis patients. *Am. J. Nephrol.* 2000, 20, 18.
- Rutkowski B., Lichodziejewska - Niemirko M., Grenda R. i wsp.: Raport o stanie leczenia nerkozastępczego w Polsce - 2005. MAKmedia. Gdańsk. 2006.
- Sander J.H. van Deventer, Buller H.R., Cate J.W. et al.: Experimental endotoxemia in humans: Analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic and complement pathways. *Blood* 1990, 76, 12, 2520.
- Schilling D., Thomas K., Nixdorff K. et al.: Toll-Like Receptor 4 and Toll-IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter Protein (TIRAP) / Myeloid Differentiation Protein 88 Adapter-Like (Mal) Contribute to Maximal IL-6 Expression in Macrophages. *J. Immunol.* 2002, 169, 5874.
- Shao J., Zydny A.L.: Effect of bleach reprocessing upon the clearance characteristics and surface charge of polysulfone hemodialyzers. *ASAIO J.* 2004, 50, 246.
- Shikano M., Sobajima H., Yoshikawa H. et al.: Usefulness of highly sensitive urinary and serum IL-6 assay in patients with diabetic nephropathy. *Nephron* 2000, 85, 81.
- Siedlar M., Szaflarska A., Szczepanik A. et al.: Depressed tumor necrosis factor alpha and interleukin-12p40 production by peripheral blood mononuclear cells of gastric cancer patients: Association with IL-1R-associated kinase-1 protein expression and disease stage. *Int. J. Cancer* 2005, 114, 144.
- Stenvinkel P., Barany P., Heimbürger O. et al.: Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: What is the role of interleukin-6? *Kidney Int.* 2002, 61, (Suppl. 80), 103.
- Stompór T., Sułowicz W.: Zespół Malnutrition - Inflammation - Atherosclerosis - istotna przyczyna zwiększonej chorobowości i śmiertelności pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek. *Nefrol. Dial. Pol.* 2002, 6, 65.
- Takeda K., Kaisho T., Akira S.: Toll-like receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 2003, 21, 335.
- Teehan G.S., Guo D., Perianayagam M.C. et al.: Reprocessed (high-flux) Polyflux dialyzers resist transmembrane endotoxin passage and attenuate inflammatory markers. *Blood Purif.* 2004, 22, 4, 329.
- Twardowski Z.J.: Dialyzer reuse - part II: advantages and disadvantages. *Semin. Dial.* 2006, 19, 3, 217.
- Upadhyay A., Sosa M.A., Jaber B.L.: Single-use versus reusable dialyzers: The known unknowns. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2007, 2, 5, 1079.
- Varela M.P., Kimmel P.L., Phillips T.M. et al.: Biocompatibility of hemodialysis membranes: Interrelations between plasma complement and cytokine levels. *Blood Purif.* 2001, 19, 370.
- Wolf S.H., Zydny A.L.: Effect of peracetic acid reprocessing on the transport characteristics of polysulfone hemodialyzers. *Artif. Organs* 2005, 29, 2, 166.
- Ziegler-Heitbrock L.: The p50 - homodimer mechanism in tolerance to LPS. *J. Endotoxin Res.* 2001, 7, 219.