

Wpływ hialuronianu na funkcje transportowe otrzewnej in vitro: analizy porównawcze

Czynniki cytoprotekcyjne mogą zmieniać strukturę otrzewnej i właściwości transportowe błony. Celem analiz było porównanie transportu mocznika (0,02 g/dl), kreatyniny (0,1 g/dl), kwasu moczowego (0,02 g/dl), insuliny (0,1 g/dl), ikodekstryny (7,5 g/dl) oraz albuminy (1 g/dl) w warunkach kontrolnych i po wprowadzeniu hialuronianu (0,4 g/dl). Eksperymenty przeprowadzono z zastosowaniem otrzewnej ściennej królika, zmodyfikowanej komory Ussinga i matematycznego modelu transportu masy. Wielkości transferu, skierowanego ze śródmiąższowej do mezotelialnej strony błony (I→M) oraz w kierunku przeciwnym (M→I) wyrażano jako współczynniki przepuszczalności dyfuzyjnej P [cm/s]. W przypadku każdej molekuly wykonano dwie odrębne serie badawcze. W pierwszej z nich analizowano dwukierunkowy transport w warunkach kontrolnych (przez 120 min), w drugiej zaś parametry transferu przed (15-60 min) i po (75-120 min) zastosowaniu hialuronianu po mezotelialnej stronie błony. W serii kontrolnej wykazano stabilność dwukierunkowego transportu mocznika, kreatyniny, kwasu moczowego, insuliny i albuminy (I→M oraz M→I) oraz pasażu ikodekstryny, skierowanego z mezotelialnej do śródmiąższowej strony błony (M→I). Średnie wartości współczynników przepuszczalności P±SEM wynosiły dla mocznika: 2,293 ± 0,211 [10⁻⁴; cm/s] i 2,621 ± 0,457 [10⁻⁴; cm/s], dla kreatyniny: 1,522 ± 0,102 [10⁻⁴; cm/s] i 1,865 ± 0,244 [10⁻⁴; cm/s], dla kwasu moczowego: 1,936 ± 0,324 [10⁻⁴; cm/s] i 2,078 ± 0,186 [10⁻⁴; cm/s], dla insuliny: 0,145 ± 0,033 [10⁻⁴; cm/s] i 0,146 ± 0,022 [10⁻⁴; cm/s] oraz dla albuminy: 0,271 ± 0,056 [10⁻⁴; cm/s] i 0,315 ± 0,057 [10⁻⁴; cm/s], odpowiednio w przypadku I→M i M→I transportu oraz 0,194 ± 0,035 dla transferu polimeru glukozy, skierowanego z mezotelialnej do śródmiąższowej strony błony. Natomiast w kierunku przeciwnym (I→M) obserwowano wzrost transportu ikodekstryny o 50%. Wartości współczynników P wynosiły 0,280 ± 0,038 [10⁻⁴; cm/s] w pierwszej godzinie eksperymentu i 0,394 ± 0,046 [10⁻⁴; cm/s] w kolejnej. Wykazano asymetrię transportu polimeru glukozy związaną z przewagą I→M pasażu. Hialuronian obniżał dwukierunkowy transfer mocznika średnio o 12% i eliminował wspomnianą asymetrię transferu ikodekstryny. Po zastosowaniu tego związku nie stwierdzono bowiem nasilenia transportu polimeru glukozy w kierunku I→M, obserwowanego w kontrolnej serii analiz. Badany glikozaminoglikan nie zmieniał natomiast współczynników przepuszczalności P w przypadku dwukierunkowego transferu pozostałych cząsteczek. Otrzymane wyniki wskazują, że in vitro hialuronian modyfikuje przeotrzewnowy transport mocznika i ikodekstryny, ale nie wpływa na przepuszczalność błony dla kreatyniny, kwasu moczowego, insuliny i albuminy.

(NEFROL. DIAL. POL. 2007, 11, 112-117)

Influence of hyaluronan on transport properties of the peritoneum in vitro: comparative analyses

Cell-protective factors may alter the peritoneal structure and transport properties of the membrane. The purpose of the studies was to compare the urea (0.02 g/dL), creatinine (0.1 g/dL), uric acid (0.02 g/dL), insulin (0.1 g/dL), icodextrin (7.5 g/dL) and albumin (1 g/dL) transport in control conditions and after application of hyaluronan (0.4 g/dL). The experiments were undertaken with use of rabbit parietal peritoneum, modified Ussing type chamber and mathematical model of mass transport. Values of the transfer, directed from the interstitial to mesothelial side of the membrane (I→M) and in the opposite direction (M→I) were expressed as coefficients of diffusive permeability P [cm/s]. In the case of each molecule, two separate series of the experiments were done. In the first one transperitoneal transport in the control conditions (during 120 min) was analyzed, and in the second transfer parameters before (15-60 min) and after hyaluronan application on the mesothelial side of the peritoneal membrane (75-120 min) were examined. Stability of urea, creatinine, uric acid, insulin and

Teresa GRZELAK

Beata SZARY

Krystyna CZYŻEWSKA

Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik: Prof. dr hab. Lech Torliński

Słowa kluczowe:

- hialuronian
- transport dyfuzyjny
- błona otrzewnowa

Key words:

- hyaluronan
- diffusive transport
- peritoneal membrane

Adres do korespondencji:

Dr n. med. Teresa Grzelak
Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu,
Pracownia Patofizjologii Błon Biologicznych,
ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań
Tel.: (61) 854-64-76, Fax: (61) 854-64-77
e-mail: tgrzelak@amp.edu.pl

albumin transport (in the case of both transfer directions) and icodextrin passage (only M→I direction) was observed in the control studies. The diffusive permeability coefficients ($P \pm \text{SEM}$) amounted at mean for urea: $2.293 \pm 0.211 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ and $2.621 \pm 0.457 [10^{-4}; \text{cm/s}]$, for creatinine: $1.522 \pm 0.102 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ and $1.865 \pm 0.244 [10^{-4}; \text{cm/s}]$, for uric acid: $1.936 \pm 0.324 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ and $2.078 \pm 0.186 [10^{-4}; \text{cm/s}]$, for insulin: $0.145 \pm 0.033 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ and $0.146 \pm 0.022 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ and for albumin: $0.271 \pm 0.056 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ and $0.315 \pm 0.057 [10^{-4}; \text{cm/s}]$, respectively in the case of I→M and M→I transport and 0.194 ± 0.035 for glucose polymer transfer, directed from the mesothelial to the interstitial side of the membrane. Next, in opposite direction (I→M) it was showed as an increase of icodextrin transport by 50%. Values of P coefficient amounted to $0.280 \pm 0.038 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ in the first hour of the experiment and $0.394 \pm 0.046 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ in the next one. One observed also asymmetry of glucose polymer transfer with I→M passage domination. Hyaluronan decreased bi-directional urea transport by a mean of 12%. The analyzed glycosaminoglycan eliminated also asymmetry of icodextrin passage. After use this compound one did not reveal intensification of glucose polymer transport in I→M direction. Hyaluronan did not change coefficients of diffusive permeability P in the case of other molecules. The obtained results show that in vitro hyaluronan modifies dynamics of transperitoneal urea and icodextrin transport, but does not influence permeability of membrane for creatinine, uric acid, insulin and albumin.

(NEPHROL. DIAL. POL. 2007, 11, 112-117)

Wstęp

Stosowanie płynów dializacyjnych o niskiej biogodności indukuje morfologiczne i funkcjonalne zmiany błony otrzewnowej [3,14]. Dlatego coraz większe zainteresowanie wzbudzają zagadnienia związane z cytoprotekcyjnym oddziaływaniem na otrzewną, m.in. glikozaminoglikanów, fosfolipidów i antyoksydantów [2,12,16,17]. Wskazuje się na korzyści zastosowania w płynach dializacyjnych kwasu hialuronowego, polianionowego polisacharydu zbudowanego z ułożonych naprzemiennie reszt N-acetyloglukozaminy i glukuronianu [16,17]. Wielkocząsteczkowe frakcje hialuronianu (HA) są istotnymi składnikami macierzy pozakomórkowej większości tkanek organizmu, w tym błony otrzewnowej. Wykazano zdolność fibroblastów i komórek mezotelialnych otrzewnej do produkcji tego związku. Obserwano nawet 10-krotne zwiększenie zawartości HA w tkance śródmiąższowej i dializacie podczas zapalenia otrzewnej [14,16,20]. Wzrost syntezy hialuronianu stwierdzono także po długookresowym wprowadzaniu do jamy otrzewnowej szczurów płynu dializacyjnego z dodatkiem N-acetyloglukozaminy [7].

Hialuronian wykazuje wielokierunkowe działanie na błonę otrzewnową [2,13]. Uczestniczy w komunikacji międzykomórkowej i bierze udział w homeostazie płynu otrzewnowego [13,18]. Wielkocząsteczkowe frakcje tego związku hamują proces włóknienia otrzewnej poprzez modyfikację aktywności inhibitorów zewnątrzkomórkowych proteinaz [27]. Osmotycznie czynny glikozaminoglikan bierze udział w *remodelingu* i regeneracji otrzewnej, wpływając na różnicowanie, proliferację i adhezję komórek [3,18,20]. Po dodaniu wysokocząsteczkowego hialuronianu do hodowli komórek mezotelialnych, izolowanych z dializatu osób poddanych dializie otrzewnowej, wykazano obniżenie stężeń mediatorów zapalenia i uszkodzenia komórek, m.in. białka chemoaktywnego monocytów (MCP-1), naczyniowego śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), rozpuszczalnej międzykomórkowej

cząsteczki adhezyjnej (s-ICAM) i fibronektyny [2]. Właściwości antyoksydacyjne HA nasuwają przypuszczenie, że mechanizm oddziaływania tego glikozaminoglikanu jest związany z obniżeniem aktywności wolnych rodników, a przez to ograniczeniem peroksydacji lipidów błonowych podczas dializoterapii. Kilkuniedniowa dializa otrzewnowa u szczurów z zastosowaniem hialuronianu (w stężeniu 0,01 g/dl) obniżyła bowiem stężenie malonaldehydu w homogenizatach otrzewnej, w porównaniu do wartości otrzymanych w przypadku dwóch grup zwierząt dializowanych roztworem NaCl z/lub bez dodatku HA o niższym stężeniu (0,001 g/dl) [26].

Oddziaływanie hialuronianu sodowego na transport związków nisko- i wysokocząsteczkowych przez błonę otrzewnową poznane jest w małym zakresie [1,16,17]. W związku z powyższym, celem podjętych badań była analiza porównawcza dynamiki przetrzynowego transportu związków o niskiej masie cząsteczkowej (moczniaka, kreatyniny i kwasu moczowego) i makromolekuł (insuliny, ikodekstryny i albuminy) w warunkach kontrolnych oraz wywołanej działaniem wysokocząsteczkowego hialuronianu sodowego.

Materiał i metody

W doświadczeniach zastosowano otrzewną, zaliczaną do tzw. złożonych układów błonowych, którą wykorzystuje się m.in. jako model do badań transportu biologicznego [6,7]. Błona otrzewnowa była izolowana z przedniej ściany brzucha królików rasy nowozelandzkiej, białej i umieszczana w zmodyfikowanej komorze Ussinga (zezwoleń nr 22/2006 Lokalnej Komisji Etycznej ds. Badań nad Zwierzętami w Poznaniu). Układ modelowy, składający się z dwóch półkomór o czynnej powierzchni błony równej 1,1 cm², łączono za pomocą przewodów polietylenowych z rezerwuarem płynu oraz pompą perystaltyczną, a następnie wypełniano płynem *Hanksa* o osmolalności 300 mOsm/kg H₂O. Odpowiednie utlenianie i stałą wartość pH płynu (równą 7,4) utrzymywano przez ciągłe wprowadzanie do układu doświadczonego miesza-

ny gazu zawierającej 95% O₂ i 5% CO₂. Objętość roztworu, krążącego przy pomocy pompy, wynosiła 13 lub 15 ml, a szybkość jego przepływu 11 ml/min. We wszystkich eksperymentach próbki (0,5-1,1 ml) pobierano regularnie co 15 minut, a następnie uzupełniano płyn, krążący po obydwu stronach błony, do pierwotnej objętości. Cały układ eksperymentalny umieszczano w komorze termostatycznej o temperaturze 37°C.

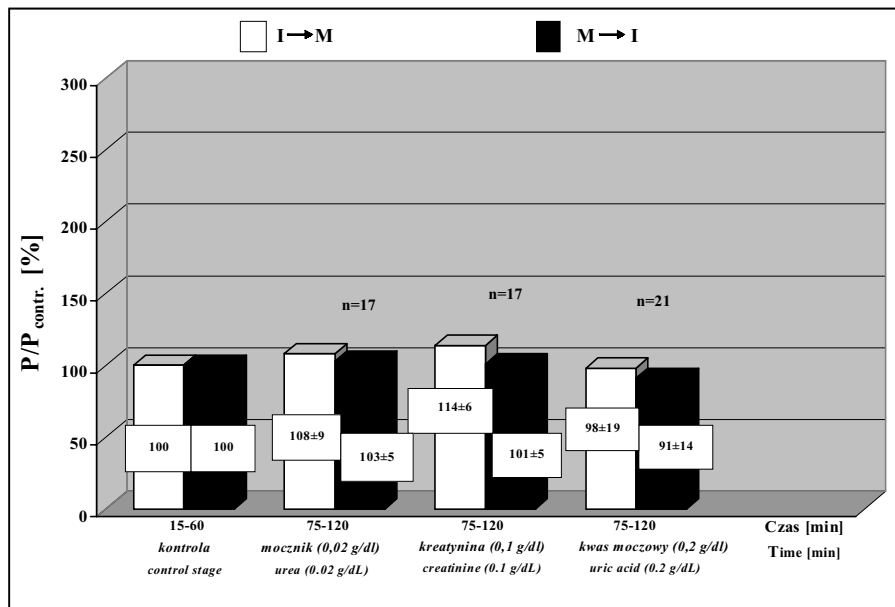
Badania eksperymentalne składały się z dwóch, odrębnych serii doświadczeń. W pierwszej, kontrolnej, wyznaczano wielkość przetrzynowego transportu mocznika (POCH - Gliwice - Polska, m.c. 60 Da), kreatyniny (Sigma - Chemical, St. Louis - USA, m.c. 113 Da), kwasu moczowego (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg - Niemcy, m.c. 168 Da), insuliny (Sigma-Chemical, St. Louis - USA m.c. 5,8 kDa), ikodekstryny (ML Laboratories PLC, Liverpool - Wielka Brytania, m.c. 14,6 kDa) i albuminy (wołowej, Frakcji V, Sigma-Chemical, St. Louis - USA, m.c. 68 kDa), skierowanego ze śródmiąższowej (I) do mezotelialnej (M) strony błony oraz w odwrotnym kierunku w czasie 120 minut. Cząsteczkę, dla której określano dynamikę dwukierunkowego transferu wprowadzano do płynu po śródmiąższowej lub mezotelialnej stronie błony. Początkowy gradient stężeń wynosił w przypadku mocznika 0,02 g/dl, kreatyniny 0,1 g/dl, kwasu moczowego 0,02 g/dl, insuliny 0,1 g/dl, ikodekstryny 7,5 g/dl, a albuminy 1 g/dl. Analogiczny schemat postępowania zastosowano w drugiej serii eksperymentalnej, która dotyczyła zmian parametrów przepuszczalności dyfuzyjnej P dla nisko- i wysokocząsteczkowych związków wywołanych działaniem hialuronianu (sól sodowa, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg - Niemcy, m.c. 2×10^6 Da). Przez 60 minut analizowano dynamikę transferu poszczególnych związków. Po godzinie doświadczenia wprowadzano do układu eksperymentalnego hialuronian sodowy (stężenie początkowe 0,04 g/dl) po mezotelialnej stronie błony i przez kolejne 60 minut przeprowadzano pomiary transportu wymienionych molekuł.

Stężenie związku, dla którego określano wielkość przepuszczalności dyfuzyjnej P , oceniano metodami biochemicznymi i enzymatycznymi. W przypadku mocznika zastosowano kilkietapową metodę enzymatyczno-kinetyczną, z ureazą i dehydrogenazą glutaminową. Stężenie kreatyniny i kwasu moczowego oznaczano z wykorzystaniem testów Liquick Cor-CREATININE (opartego na zmodyfikowanej metodzie *Jaffe*'go, bez odbiałczania) i Liquick Cor-UA (metoda enzymatyczna z urikazą i peroksydazą), (Cormay, Lublin - Polska). Z kolei, stężenia insuliny i albuminy ustalano dzięki zastosowaniu testu Protein Assay Kit (Sigma-Chemical, St. Louis - USA), opartego na zmodyfikowanej mikrometodzie *Lowry*. W celu określenia stężenia ikodekstryny wykorzystano kilkietapową metodę enzymatyczną z amyloglukozydazą (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis - USA), oksydazą glukozową i peroksydazą (Cormay, Lublin - Polska). Metoda ta została zaproponowana przez Wang R. i wsp. [Perit. Dial. Int. 2001, 21, 269] oraz dostosowana do potrzeb prezentowanych badań *in vitro* [21,22].

Do analizy wielkości transferu zastosowano model matematyczny, który zakłada dyfuzyjny charakter transportu, a także dobre mieszanie płynu wewnątrz komory *Ussinga* [4]. Otrzymane wyniki wyrażano w postaci współczynnika przepuszczalności dyfuzyjnej P w cm/s . Modyfikacje w transporcie cząsteczek określano w procentach wartości kontrolnych $P_{\text{badane}}/P_{\text{kontrolne}}$ przyjmując za 100% średnie wielkości transferu uzyskane przed zmianą warunków doświadczenia. Procentowe wartości P wyznaczano oddzielnie dla każdego eksperymentu, a następnie podawano średnią dla całej serii doświadczeń. Ze względu na zróżnicowanie grup badawczych pod względem liczebności obliczano błąd standardowy średniej (SEM - *standard error of the mean*). Ocenę statystyczną otrzymanych wartości współczynników transportu przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 7.1 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA) i testów *t-Studenta* oraz *Wilcoxon*a dla zmiennych powiązanych. Do analizy rozkładów danych użyto testu *Shapiro -Wilka*. Jako istotną statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$.

Wyniki badań

W warunkach kontrolnych dynamika dwukierunkowego transportu mocznika, kreatyniny, kwasu moczowego, insuliny i albuminy oraz transferu ikodekstryny, skierowanego z mezotelialnej do śródmiąższowej strony błony ($M \rightarrow I$) była stabilna. Współczynniki przepuszczalności dyfuzyjnej ($I \rightarrow M$ i $M \rightarrow I$) wynosiły średnio $P \pm \text{SEM}$ dla mocznika: $2,293 \pm 0,211 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ i $2,621 \pm 0,457 [10^{-4}; \text{cm/s}]$; dla kreatyniny: $1,522 \pm 0,102 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ i $1,865 \pm 0,244 [10^{-4}; \text{cm/s}]$; dla kwasu moczowego: $1,936 \pm 0,324 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ i $2,078 \pm 0,186 [10^{-4}; \text{cm/s}]$, dla insuliny: $0,145 \pm 0,033 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ i $0,146 \pm 0,022 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ oraz dla albuminy: $0,271 \pm 0,056 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ i $0,315 \pm 0,057 [10^{-4}; \text{cm/s}]$. W przypadku transportu polimeru glukozy, skierowanego z mezotelialnej do śródmiąższowej strony błony, wartość P wynosiła $0,194 \pm 0,035 [10^{-4}; \text{cm/s}]$. Natomiast w kierunku przeciwnym ($I \rightarrow M$) wykazano wzrost transferu ikodekstryny o 50% w czasie 120 min. doświadczenia. Średnie wartości współczynnika przepuszczalności dy-

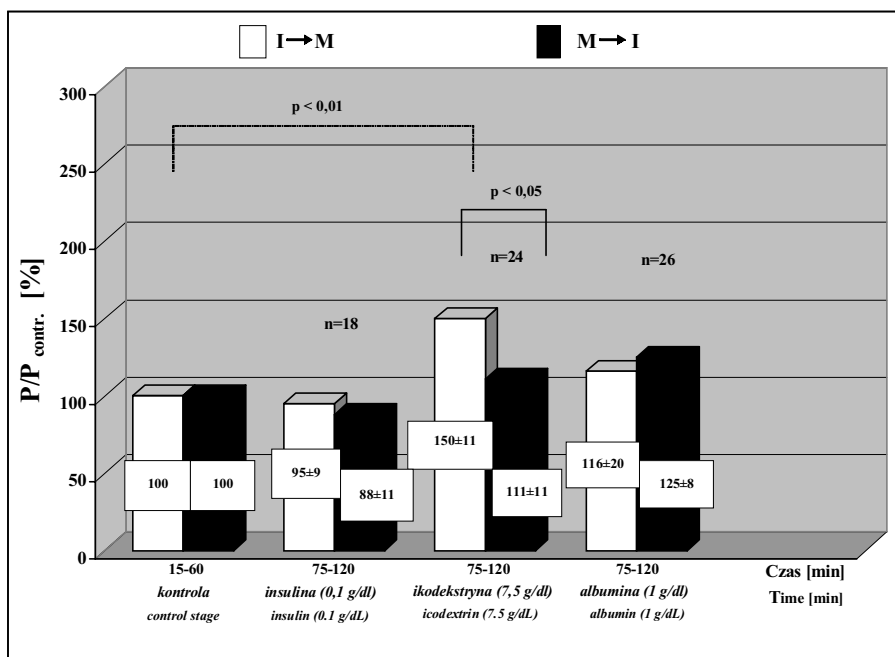


Rycina 1

Dynamika otrzewnowego transportu mocznika, kreatyniny i kwasu moczowego *in vitro*, skierowanego ze śródmiąższowej (I) do mezotelialnej (M) strony błony oraz w kierunku przeciwnym, w warunkach kontrolnych.

Dynamics of *in vitro* urea, creatinine and uric acid peritoneal transport, directed from the interstitial (I) to the mesothelial (M) side of the membrane and in the opposite direction in control conditions.

Za 100% przyjęto średnie wartości współczynników przepuszczalności dyfuzyjnej P ($\pm \text{SEM}$) uzyskane w pierwszej godzinie doświadczenia.



Rycina 2

Dynamika otrzewnowego transportu insuliny, ikodekstryny i albuminy *in vitro*, skierowanego ze śródmiąższowej (I) do mezotelialnej (M) strony błony oraz w kierunku przeciwnym, w warunkach kontrolnych.

Dynamics of *in vitro* insulin, icodextrin and albumin peritoneal transport, directed from the interstitial (I) to the mesothelial (M) side of the membrane and in the opposite direction in control conditions.

Za 100% przyjęto średnie wartości współczynników przepuszczalności dyfuzyjnej P ($\pm \text{SEM}$) uzyskane w pierwszej godzinie doświadczenia.

fuzyjnej wynosiły $0,280 \pm 0,038 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ dla pierwszej godziny eksperymentu i $0,394 \pm 0,046 [10^{-4}; \text{cm/s}]$ dla kolejnej. Obserwano także asymetrię transferu polimeru glukozy polegającą na przewadze pasażu skierowanego ze śródmiąższowej do mezotelialnej strony błony (por. rycina 1, 2).

Hialuronian sodowy obniżał o 11% trans-

port mocznika, skierowany ze śródmiąższowej do mezotelialnej strony błony, a w kierunku odwrotnym o 12% (por. rycina 3). Badany glikozaminoglikan zmniejszał także $I \rightarrow M$ transport ikodekstryny, w porównaniu do serii kontrolnej, nie wpływając na pasaż w kierunku przeciwnym. W związku z tym hialuronian sodowy eliminował asymetrię

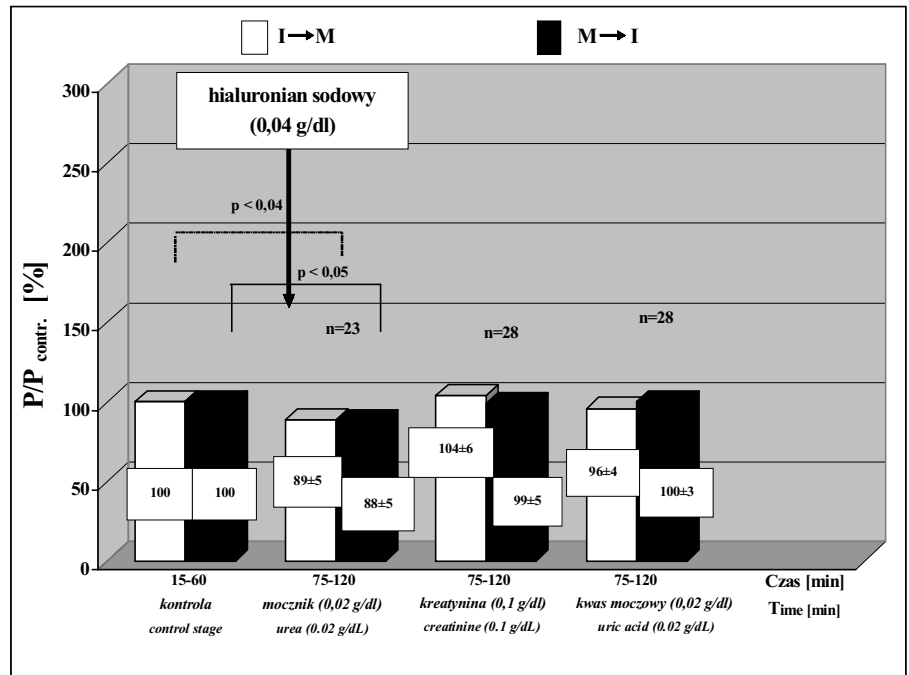
transferu polimeru glukozy. W serii kontrolnej obserwowano bowiem wzrost transportu tej makrocząsteczki, skierowanego ze śródmiąższowej do mezotelialnej powierzchni błony, czego nie stwierdzono po zastosowaniu glikozaminoglikanu (por. rycina 4). Hialuronian sodowy nie zmieniał współczynników przepuszczalności dyfuzyjnej P dla kreatyniny, kwasu moczowego, insuliny i albuminy (por. rycina 3, 4).

Omówienie

Przeprowadzone badania *in vivo* oraz *in vitro* wskazują na złożoność przetworzonego transportu małych i dużych molekuł. Transfer cząsteczek, zachodzący w dwóch przeciwstawnych kierunkach pomiędzy łożyskiem naczyniowym a jamą brzuszną, jest ograniczony przez struktury błony otrzewnowej, które stanowią odrębne bariery anatomiczne. Należą do nich: *endotelium* naczyniowe i *mezotelium* wraz z błonami podstawnymi oraz *interstitium*. Nie bez znaczenia są także warstwy płynu stagnacyjnego, przylegające do struktur granicznych otrzewnej, tj. endotelialnej i mezotelialnej. Podczas dializy otrzewnowej transport molekuł zachodzi głównie na drodze prostej dyfuzji i konwekcji, wywołanych gradientem stężeń substancji między dializatem a krwią, a także różnic ciśnień hydrostatycznych, osmotycznych i/lub onkotycznych [5, 14]. Nie można także wykluczyć transcellularnej drogi przetworzonego transferu cząsteczek, dyfuzji ułatwionej oraz komponenty transportu aktywnego, przebiegającego niezgodnie z równowagą termodynamiczną.

Zależność pomiędzy wielkościami wskaźników transferu cząsteczek i ich właściwościami fizyko-chemicznymi jest wieloczynnikowa. Szybkość transportu molekuł, skierowanego z łożyska naczyniowego do jamy otrzewnowej, uwarunkowana jest masą cząsteczkową, kształtem, gęstością, rozpuszczalnością w wodzie i tłuszczach, obecnością otoczki hydratacyjnej i ładunków elektrycznych oraz zdolnością do agregacji i wiązania z innymi związkami. Warto podkreślić, iż w przypadku związków wielocząsteczkowych pasaż z jamy otrzewnowej do krwi, zachodzi głównie na drodze limfatycznej i nie zależy od wielkości transportowanych molekuł [5, 14, 19].

W prezentowanych badaniach *in vitro* najwyższe wartości przepuszczalności dyfuzyjnej wykazano w przypadku najmniejszych molekuł, tj. mocznika (o masie cząsteczkowej 60 Da), kreatyniny (m.c. 113 Da) i kwasu moczowego (m.c. 168 Da). Średnie wielkości współczynników $P \pm SEM$ wynosiły odpowiednio: $2,467 \pm 0,257 [10^{-4}, \text{cm/s}]$; $1,724 \pm 0,153 [10^{-4}, \text{cm/s}]$ i $2,017 \pm 0,171 [10^{-4}, \text{cm/s}]$. Wielokrotnie niższe były parametry transportu w przypadku insuliny (m.c. 5,8 kDa), ikodekstryny (m.c. 14,6 kDa) i albuminy (m.c. 68 kDa), odpowiednio: $0,146 \pm 0,019 [10^{-4}, \text{cm/s}]$; $0,251 \pm 0,028 [10^{-4}, \text{cm/s}]$ i $0,293 \pm 0,039 [10^{-4}, \text{cm/s}]$. Nie stwierdzono jednak odwrotnie proporcjonalnej zależności pomiędzy masą cząsteczkową i wielkościami transferu. Należy podkreślić, iż badane molekuły oprócz masy cząsteczkowej, różniły się między sobą np. przestrzenną budową, obecnością ładunków elektrycznych i zdolnością do agregacji, co utrudnia bezpośrednie analizy porów-

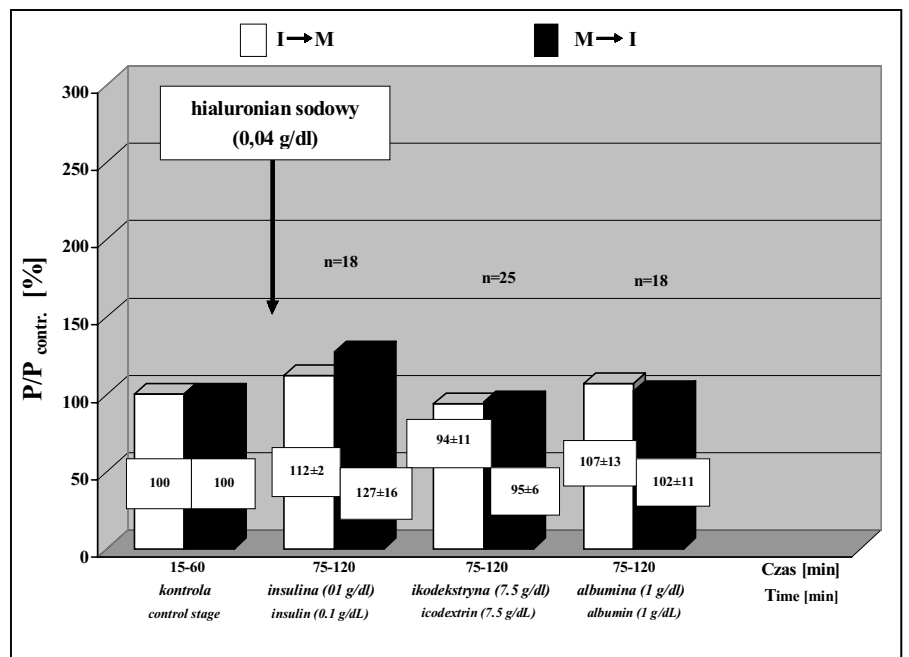


Rycina 3

Zmiany w otrzewnowym transporcie mocznika, kreatyniny i kwasu moczowego, skierowanym ze śródmiąższowej (I) do mezotelialnej (M) strony błony oraz w kierunku przeciwnym, wywołane hialuronianem sodowym w warunkach *in vitro*.

Changes of *in vitro* urea, creatinine and uric acid peritoneal transport, directed from the interstitial (I) to the mesothelial (M) side of the membrane and in the opposite direction, caused by sodium hyaluronan.

Za 100% przyjęto średnie wartości współczynników przepuszczalności dyfuzyjnej P ($\pm SEM$) uzyskane przed zmianą warunków doświadczenia.



Rycina 4

Zmiany w otrzewnowym transporcie insuliny, albuminy i ikodekstryny, skierowanym ze śródmiąższowej (I) do mezotelialnej (M) strony błony oraz w kierunku przeciwnym, wywołane hialuronianem sodowym w warunkach *in vitro*.

Changes of *in vitro* insulin, icodextrin and albumin peritoneal transport, directed from the interstitial (I) to the mesothelial (M) side of the membrane and in the opposite direction, caused by sodium hyaluronan.

Za 100% przyjęto średnie wartości współczynników przepuszczalności dyfuzyjnej P ($\pm SEM$) uzyskane przed zmianą warunków doświadczenia.

nawcze. Na przykład, stosunkowo niskie parametry dwukierunkowego transferu w przypadku insuliny wiązały się prawdopodobnie z jej specyficzną zdolnością do łatwego tworzenia (poprzez wiązania wodoro-

cząsteczkowej i obszernej przestrzennej struktury.

Przeprowadzone analizy wykazały, iż w warunkach kontrolnych wartości współczynników przepuszczalności dyfuzyjnej w przypadku mocznika, kreatyniny, kwasu moczowego

wego, insuliny i albuminy nie zmieniały się w czasie i były zbliżone dla obydwu kierunków transferu. Natomiast parametry te dla ikodekstryny i pasażu skierowanego ze śródmiaższowej do mezotelialnej strony błony charakteryzowały się tendencją wzrostową w czasie 120 min. doświadczenia (nasilenie transportu o 50%). Ponadto, zwraca uwagę asymetria transferu polimeru glukozy, charakteryzująca się przewagą pasażu skierowanego ze śródmiaższowej do mezotelialnej powierzchni błony nad transportem w odwrotnym kierunku. Wzrost I→M transferu tego związku w czasie eksperymentu, jest trudny do wyjaśnienia na podstawie przeprowadzonych analiz. Prawdopodobnie mógł on wynikać z częściowej depolimeryzacji ikodekstryny na mniejsze cząsteczki, zmiany osmolalności płynu i/lub strukturalnych i funkcjonalnych modyfikacji otrzewnej, wywołanych polimerem glukozy lub produktami jego rozpadu [8, 10, 15, 22, 23].

U szczurów poddanych dializie otrzewnej stwierdzono wzrost osmolalności roztworu dializacyjnego z 290 do 350 mOsmol/kg H₂O w związku z enzymatyczną degradacją ikodekstryny do fragmentów o mniejszej masie cząsteczkowej (głównie maltozy i maltotriozy) [15]. Należy podkreślić, iż prawdopodobnie w związku z heterogennością międzygatunkową aktywności amylazy (odpowiedzialnej za rozkład polimeru do oligosacharydów) nie obserwowano takich zmian w przypadku dializy otrzewnej u ludzi, z wykorzystaniem płynów opartych na polimerze glukozy [15, 23]. Wstępne badania *in vitro* nie wykazały wysokiej aktywności amylazy w płynie opłukującym izolowaną otrzewną ścienną królika, umieszczonej w układzie eksperymentalnym (dane niepublikowane). Można przypuścić, iż zmiany dynamiki transferu ikodekstryny są wynikiem przemieszczania się wody w kierunku M→I, której nie towarzyszył transport polimeru, nieenzymatycznej degradacji cząsteczki lub modyfikacji struktury otrzewnej wywołanej ikodekstryną.

Niektóre badania sugerują, iż dootrzewnowe wprowadzanie polimeru glukozy może wywoływać zaburzenia strukturalne w obrębie poszczególnych struktur otrzewnej (o charakterze chemicznego zapalenia), prowadzące do zmian jej właściwości transportowych [8, 10]. Podczas zabiegu dializy otrzewnowej u zwierząt obserwowano m.in. zmniejszenie objętości oraz obniżenie żywotności komórek mezotelialnych już po 2 godzinach ekspozycji na ikodekstrynę. Wiązało się to z przemieszczaniem wody z przestrzeni wewnątrz- do pozakomórkowej. W przypadku dłuższych doświadczeń (15-dniowych) stwierdzono obecność tzw. olbrzymich komórek mezotelialnych (o dużym promieniu i polu powierzchni oraz zwiększonym indeksie jądro/cytoplazma). Powyższe zaburzenia utrzymywały się przez 2 miesiące po zaprzestaniu dializy u zwierząt. Opiswane zmiany prawdopodobnie były wynikiem indukowanej przez ikodekstrynę peroksydacji lipidów warstwy mezotelialnej [10]. Zaburzenia morfologiczne w obrębie struktur otrzewnej związane z oddziaływaniem polimeru glukozy mogą przyczyniać się do modyfikacji transportu nisko- i wysokocząsteczkowych związków przez błonę otrzewnową. Między innymi obserwowano wzrost

klirensu białka całkowitego po jednorazowym oraz długoterminowym stosowaniu polimeru glukozy u dializowanych szczurów [8]. Ponadto, we wcześniejszych badaniach *in vitro* z zastosowaniem otrzewnej królików stwierdzono modyfikację przeczotrzewnowego transportu kwasu moczowego i albuminy pod wpływem ikodekstryny [11].

Wyniki badań *in vivo* oraz *in vitro*, dotyczących wpływu hialuronianu na funkcje transportowe błony otrzewnowej, są zróżnicowane i zależą od masy cząsteczkowej, stężenia oraz czasu stosowania tego związku. Glikozaminoglikan o niskiej masie cząsteczkowej (0,5 x 10⁶ Da) w płynie dializacyjnym zwiększał utratę białek do jamy otrzewnowej [24]. Z kolei, wysokocząsteczkowe frakcje HA (o m.c. powyżej 1,6 x 10⁶ Da) obniżały lub nie wpływały na przeczotrzewnowy transport nisko- i wysokocząsteczkowych związków, a efekty działania nasilały się wraz z wydłużaniem czasu ekspozycji oraz wzrostem zastosowanego stężenia glikozaminoglikanu (w zakresie 0,01-0,1 g/dl) [1, 16, 17, 24].

Kliniczne badania wykazały brak wpływu wysokocząsteczkowych frakcji hialuronianu (m.c. 2 x 10⁶ Da) w stężeniach 0,01 g/dl i 0,05 g/dl, podanych jednorazowo do otrzewnej wraz ze standardowym płynem dializacyjnym, na klirensy mocznika, kreatyniny i albuminy po 3 i 6 godzinach leczenia dializą [16]. Podobnie, dootrzewnowe wprowadzenie płynu glukozowego (3,86 g/dl) z wysokocząsteczkowym hialuronianem (0,01 g/dl) u dializowanych przez 4 godziny zwierząt doświadczalnych nie wpływało na dwukierunkowy transport albuminy [20]. Zastosowanie natomiast u szczurów płynu z dodatkiem 0,025 g/dl HA (m.c. 1,6 x 10⁶ Da) podczas 7-dniowej dializy otrzewnowej obniżało wskaźniki K_{BD} (*Diffusive Mass Transport Coefficient*) mierzone po 4 godzinach równoważenia w przypadku sodu, potasu, mocznika i glukozy, a także wielkość absorpcji albuminy z jamy otrzewnowej do otaczających tkanek, w porównaniu do zwierząt dializowanych standardowym płynem opartym na glukozie. Nie wykazano zaś różnicy tych parametrów w stosunku do wyników otrzymanych w grupie kontrolnej (nie-dializowanej). W przypadku wskaźników transferu białka całkowitego stwierdzono zaś spadek transportu po zastosowaniu hialuronianu, zarówno w stosunku do zwierząt kontrolnych, jak i dializowanych standardowym płynem glukozowym [13].

W innych badaniach, wielkocząsteczkowy polisacharyd (m.c. powyżej 1 x 10⁶ Da) w wysokim stężeniu (0,05 g/dl) podany jednorazowo, nie wpływał na absorpcję, ale zmniejszał otrzewnowy klirens albuminy u zwierząt doświadczalnych. Zastosowanie zaś hialuronianu w stężeniu 0,1 g/dl wywoływało obniżenie transferu białka całkowitego w obu kierunkach [20]. Spadek wskaźników otrzewnowego klirensu i absorpcji dla protein wykazano także w przypadku wydłużenia do czterech tygodni dializy otrzewnowej u szczurów, u których stosowano płyn glukozowy z dodatkiem HA (m.c. 1,6 x 10⁶ Da) w niskim stężeniu (0,01 g/dl), w porównaniu do grupy kontrolnej dializowanej standardowym płynem opartym na glukozie [17].

Wprowadzony do jamy otrzewnowej hialuronian tworzy sieć gęsto ułożonych, ujemnie naładowanych łańcuchów polisacharydo-

wych (tzw. „*filter cake*”) wpływających na homeostazę wodną [13, 20, 25]. U dializowanych szczurów zastosowanie HA wywoływało wzrost ultrafiltracji netto, w związku ze zmniejszeniem reabsorpcji płynu z przestrzeni wewnątrzotrzewnowej, związanej z obniżeniem przewodności hydraulicznej tkanki śródmiaższowej [1, 17, 25]. Struktura przestrzenna hialuronianu (obecność dużej liczby grup hydroksylowych oraz łańcuchów ujemnych) umożliwia wiązanie wody, a przez to stanowi dodatkową barierę dla swobodnego przepływu cząsteczek [3, 20]. Prezentowane wyniki badań *in vitro* wskazują, iż wprowadzenie do układu doświadczalnego wysokocząsteczkowego hialuronianu wpływa na pasaż molekuli o niskiej masie cząsteczkowej, których parametry transportu przez błonę otrzewnową są najwyższe. W przedstawionych analizach HA (m.c. 2 x 10⁶ Da) w stężeniu 0,04 g/dl obniżał bowiem wskaźnik przepuszczalności dyfuzyjnej P w przypadku dwukierunkowego transferu mocznika, średnio o 12%. Nie stwierdzono natomiast zmian w dwukierunkowym transporcie związków o wyższej niż mocznik masie cząsteczkowej, takich jak: kreatynina, kwas moczowy, insulina i albumina oraz transferze polimeru glukozy, skierowanym z mezotelialnej do śródmiaższowej strony błony. Niewykluczone, że obniżenie I→M transportu ikodekstryny (w porównaniu do serii kontrolnej) po zastosowaniu HA, wiązało się z hamowaniem transferu niskocząsteczkowych produktów degradacji polimeru glukozy przez wspomniany filtr hialuronianu. W przypadku przeczotrzewnowego pasażu ikodekstryny, wysokocząsteczkowe frakcje badanego glikozaminoglikanu mogły przywracać integralność błony, naruszoną przez działanie wysokich stężeń polimeru glukozy i/lub jego produktów rozpadu, a przez to wpływać pośrednio na przepuszczalność otrzewnej.

Warto podkreślić, iż wraz ze wzrostem stężenia hialuronianu (w zakresie 0,01-0,1 g/dl), zastosowanego w płynie dializacyjnym, zwiększa się lepkość roztworu (od 1,5 do 4,8 cP) i zgodnie z I prawem *Ficka* zmniejsza się dyfuzja cząsteczek rozpuszczonych w tym roztworze [3, 19, 20]. Prawdopodobnie zwiększa się także grubość warstwy stagnacyjnej płynu, stykającego się ze strukturami granicznymi błony [20]. Wpływać to może na obniżenie transportu w związku z wydłużoną drogą, jaką muszą pokonać molekuly. Znaczenie tej bariery w przeczotrzewnowym transferze nisko- i wysokocząsteczkowych związków potwierdzono pośrednio w badaniach klinicznych, w których wykazano, że znaczna prędkość (100 ml/min) przepływu roztworu dializacyjnego, zastosowana podczas wysokowydajnej, automatycznej dializy otrzewnowej, zwiększyła o 60% klirens mocznika oraz o 25% klirens β₂-mikroglobuliny po 8 godzinach zabiegu, w porównaniu do wartości uzyskanych podczas nocnej, przerywanej dializy otrzewnowej [9].

Wnioski

1. *In vitro* dynamika przeczotrzewnowego transportu mocznika, kreatyniny, kwasu moczowego, insuliny i albuminy jest stabilna, natomiast pasaż ikodekstryny wykazu-

je asymetrię, związaną z przewagą transferu ze śródmiąższowej do mezotelialnej strony błony, nad transportem w kierunku przeciwnym.

2. Wysokocząsteczkowa frakcja hialuronianu sodowego *in vitro* nie zmienia dynamiki przetrzewnowego transferu kreatyniny, kwasu moczowego, insuliny i albuminy, ale obniża dwukierunkowy transfer moczniaka i jednokierunkowy (I→M) ikodekstryny.

Piśmiennictwo

1. Bręborowicz A., Połubińska A., Pawlaczyk K. et al.: Intraperitoneal hyaluronan administration in conscious rats: absorption, metabolism, and effects on peritoneal fluid dynamics. *Perit. Dial. Int.* 2001, 21, 130.
2. Bręborowicz A., Pyda M., Moberly J., et al.: Effect of hyaluronan-supplemented dialysate on *in vitro* function of human peritoneal mesothelial cells. *Am. J. Nephrol.* 2004, 24, 316.
3. Cohen M., Klein E., Geiger B., Addadi L.: Organization and adhesive properties of the hyaluronan pericellular coat of chondrocytes and epithelial cells. *Biophysical J.* 2003, 85, 1996.
4. Czyżewska K., Szary B., Waniewski J.: Transperitoneal transport of glucose *in vitro*. *Artif. Organs* 2000, 24, 857.
5. Czyżewska K., Szary B.: Przetrzewnowy transport glukozy. Studium funkcji i efektów. Wydawnictwa Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2001.
6. Czyżewska K., Szary B., Grzelak T.: Peritoneal transport dynamics of glucose and icodextrin: the *in vitro* comparative studies. *Adv. Perit. Dial.* 2005, 21, 53.
7. Flessner M.F., Lofthouse J., Williams A.: Chronic alteration of subperitoneal tissue and peritoneal transport. *Adv. Perit. Dial.* 2002, 18, 12.
8. Frajewicki V., Kushnir D., Wajsbrodt V. et al.: Peritoneal transport after long-term exposure to icodextrin in rats. *Nephron* 2002, 92, 174.
9. Freida P., Issad B.: Continuous flow peritoneal dialysis: assessment of fluid and solute removal in a high-flow model of "fresh dialysate single pass". *Perit. Dial. Int.* 2003, 23, 348.
10. Gotloib L., Wajsbrodt V., Shostak A.: Mesothelial dysplastic changes and lipid peroxidation induced by 7.5% icodextrin. *Nephron* 2002, 92, 142.
11. Grzelak T., Szary B., Czyżewska K.: Effect of icodextrin on transperitoneal uric acid and albumin transport *in vitro*. *Adv. Perit. Dial.* 2004, 20, 47.
12. Grzelak T., Czyżewska K., Szary B.: Wpływ hialuronianu na przepuszczalność błony otrzewnowej dla makrocząsteczek *in vitro*. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2005, 6, 1163.
13. Guo Q., Peng W., Cheng H. et al.: Hyaluronan preserves peritoneal membrane transport properties. *Perit. Dial. Int.* 2001, 21, 136.
14. Krediet R.T.: Peritoneal physiology - impact on solute and fluid clearance. *Adv. Ren. Replace Ther.* 2000, 7, 271.
15. Moberly J.B., Mujais S., Gehr T., et al.: Pharmacokinetics of icodextrin in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int.* 2002, 62 (Suppl. 81), S23.
16. Moberly J.B., Sorkin M., Kucharski A. et al.: Effects of intraperitoneal hyaluronan on peritoneal fluid and solute transport in peritoneal dialysis patients. *Perit. Dial. Int.* 2003, 23, 63.
17. Połubińska A., Pawlaczyk K., Kuźlan-Pawlaczyk M. et al.: Dialysis solution containing hyaluronan: Effect on peritoneal permeability and inflammation in rats. *Kidney Int.* 2000, 57, 1182.
18. Reijnen M.M.P.J., Falk P., van Goor H., Holmdahl L.: The antiadhesive agent sodium hyaluronate increases the proliferation rate of human peritoneal mesothelial cells. *Fertil. Steril.* 2000, 74, 146.
19. Rippe B., Krediet R.T.: Peritoneal physiology - transport of solutes. W: *The Textbook of Peritoneal Dialysis*. Gokal R., Nolph K.D., Red., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1994, 69.
20. Rosengren B.-I., Carlsson O., Rippe B.: Hyaluronan and peritoneal ultrafiltration: A test of the "Filtercake" hypothesis. *Am. J. Kidney Dis.* 2001, 37, 1277.
21. Szary B., Czyżewska K., Grzelak T., Kędzierski S.: Przetrzewnowy transport ikodekstryny: badania czynnościowe i morfologiczne. *Nefrol. Dial. Pol.* 2005, 9, 74.
22. Szary B., Grzelak T., Czyżewska K.: Icodextrin peritoneal transport *in vitro*: Effect of sodium deoxycholate, glucose, and methylglyoxal. *Artificial Organs* 2007, 31, 140.
23. de Waart D.R., Zweers M.M., Struijk D.G., Krediet R.T.: Icodextrin degradation products in spent dialysate of CAPD patients and the rat, and its relation with dialysate osmolality. *Perit. Dial. Int.* 2001, 21, 269.
24. Wang T., Cheung H., Heimbürger O., et al.: Hyaluronan prevents the decreased net ultrafiltration caused by increased peritoneal dialysate fill volume. *Kidney Int.* 1998, 53, 496.
25. Wang T., Cheng H., Heimbürger O., et al.: Hyaluronan decreases peritoneal fluid absorption: Effect of molecular weight and concentration of hyaluronan. *Kidney Int.* 1999, 55, 667.
26. Wieczorowska K., Bręborowicz A., Martis L., Oreopoulos D.G.: Protective effect of hyaluronic acid against peritoneal injury. *Perit. Dial. Int.* 1995, 15, 81.
27. Yung S., Li F.K., Chan T.M.: Peritoneal mesothelial cell culture and biology. *Perit. Dial. Int.* 2006, 26, 162.