

Otwarte, randomizowane, kontrolowane badanie typu cross-over badające wpływ pojedynczego zabiegu dużej autohemoterapii ozonowej na płynność błony erytrocytarnej pacjentów przewlekle hemodializowanych z miażdżycą zarostową tętnic

Miażdżycza zarostowa tętnic kończyn dolnych (PAOD) pacjentów hemodializowanych (HD) jest jednym z wielu powodów zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych wśród tych chorych. Wiele tradycyjnych sposobów leczenia PAOD jest nieskuteczna. Duża autohemoterapia ozonowa (MAHTO3) jest komplementarną metodą medyczną stosowaną w leczeniu tej choroby. Celem tego otwartego, randomizowanego, kontrolowanego badania typu cross-over było zbadanie wpływu pojedynczej dawki MAHTO3 na wzrost płynności błony erytrocytarnej ($\Delta le / \Delta lm$) pacjentów przewlekle HD z PAOD. U 14 pacjentów (6 K, 8 M) w wieku $61,14 \pm 1,55$ lat podczas HD wykonano pojedynczy zabieg MAHTO3 (100 ml mieszaniny tlenowo-ozonowej o stężeniu ozonu $50 \mu g/ml$ rozpuszczone w 100 ml krwi pacjenta). Grupy kontrolne stanowili ci sami pacjenci poddani zabiegowi HD bez MAHTO3 i zabiegowi HD z dużą autohemoterapią z podaniem tlenu (MAHTO2). $\Delta le / \Delta lm$ mierzono metodą spektrofotometryczną (znakowanie DPyP). Stwierdzono statystycznie znamienne wzrost $\Delta le / \Delta lm$ po 4 godzinach od zabiegu MAHTO3 oraz wzrost $\Delta le / \Delta lm$ po 4 h w stosunku do $\Delta le / \Delta lm$ przed zabiegiem po MAHTO3 w stosunku do kontroli: zabiegu HD ($0,157 \pm 0,05$ vs $0,015 \pm 0,031$; $p=0,02$) i MAHTO2 ($0,157 \pm 0,05$ vs $-0,014 \pm 0,017$; $p=0,002$). Wyniki badania wskazują na możliwość wpływu pojedynczej dawki ozonu na wzrost $\Delta le / \Delta lm$. Przeprowadzenie badania kontrolowanego przy pełnym cyklu leczenia może wskazać, czy zabiegi MAHTO3 wpływają na dłuższy i trwalszy wzrost $\Delta le / \Delta lm$ pacjentów HD, co z kolei można by wykorzystać w leczeniu PAOD.

(NEFROL. DIAL. POL. 2011, 15, 39-42)

An open-label, randomized, controlled, cross-over study to investigate the influence of single dose of major ozonated autohemotherapy on erythrocyte's fluidity in the chronic hemodialysed patients with peripheral artery occlusive disease

Peripheral artery occlusive disease (PAOD) in hemodialyzed patients (HD) is a one of many causes of death from cardio-vascular reasons among these patients. Many traditional PAOD therapy methods is ineffective. Major ozonated autohemotherapy (MAHTO3) is complementary medical approach in the treatment this disease. The aim this an open-label, randomized, controlled, cross-over study was to investigate the influence of single dose of MAHTO3 on erythrocyte's membrane fluidity ($\Delta le / \Delta lm$) in the chronic HD patients with PAOD. In 14 patients (6 F, 8 M) aged 61.14 ± 1.55 years single MAHTO3 procedure was performed during HD session (100 ml oxygen-ozone mixture with ozone concentration $50 \mu g/ml$ dissolved in 100 ml of patient's blood). The control groups were the same patients treated single HD session without MAHTO3 and major autohemotherapy session with oxygen application (MAHTO2). $\Delta le / \Delta lm$ was assessed using fluorescence spectrometry (DPyP labeling). Statistically significant $\Delta le / \Delta lm$ increase after 4 hours after MAHTO3 and increase of $\Delta le / \Delta lm$ 4h after MAHTO3 session in comparison to $\Delta le / \Delta lm$ before MAHTO3 session compare to controls: HD session (0.157 ± 0.05 vs 0.015 ± 0.031 ; $p=0.02$) and MAHTO2 session (0.157 ± 0.05 vs -0.014 ± 0.017 ; $p=0.002$). The results indicate the possibility influence single ozone dose on erythrocyte's membrane fluidity. The carry out of controlled study with full therapy cycle may indicate if MAHTO3 influences longer and permanent erythrocyte's membrane fluidity increase in patients on HD and it may be introduced in PAOD treatment.

(NEPHROL. DIAL. POL. 2011, 15, 39-42)

Bogdan BIEDUNKIEWICZ¹

Leszek TYLICKI¹

Tomasz NIEWĘGŁOWSKI²

Przemysław RUTKOWSKI¹

Aleksandra ŚLIWIŃSKA³

Ewa ALEKSANDROWICZ³

Bolesław RUTKOWSKI¹

¹Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych GUMed w Gdańsku.

²Centrum Zdrowia ETER-MED® sp. z o.o. w Gdańsku.

³Katedra Żywienia Klinicznego GUMed w Gdańsku.

Słowa kluczowe:

- hemodializa
- miażdżycza zarostowa tętnic kończyn dolnych
- płynność błony erytrocyta
- ozonoterapia

Key words:

- hemodialysis
- peripheral artery occlusive disease
- erythrocyte's membrane fluidity
- ozonotherapy

Adres do korespondencji:
Dr Bogdan Biedunkiewicz
Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii
i Chorób Wewnętrznych GUMed
Ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk
Tel: 583492505; fax: 583492551
e-mail: bbied@gumed.edu.pl

Wstęp

Choroby układu sercowo-naczyniowego są pierwszą przyczyną zgonu pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych przewlekłą hemodializą (HD). Jest to wynikiem szczególnego ich narażenia na rozwój miażdżycy. Wśród chorób sercowo-naczyniowych PAOD występująca u około 23% pacjentów HD jest główną przyczyną amputacji i jedną z wielu przyczyn zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych pacjentów dializowanych [14]. Wiele tradycyjnych sposobów leczenia PAOD jest niestety nieskuteczna, szczególnie w przypadku rozsiaanych zmian miażdżycowych. W związku z tym poszukuje się innych, komplementarnych metod leczenia. Jedną z nich jest ozonoterapia - metoda leczenia stosowana powszechnie w takich krajach jak Niemcy, Włochy, czy Hiszpania. Od 2001 roku również nasz zespół prowadzi badania dotyczące efektów leczenia ozonem u pacjentów HD z PAOD. W tym celu stosujemy metodę leczenia zwaną dużą autohemoterapią ozonową (major ozonated autohemotherapy - MAHTO3), w której od pacjenta pobiera się, a następnie przetacza za powrotem ozonowaną krew własną. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdziliśmy, że ozon stosowany w dawkach leczniczych powoduje wydłużenie dystansu przechodzonego przez pacjenta bez bólu w trakcie próby marszowej [3, 20]. Ujawnia się również korzystny wpływ leczenia na profil lipidowy osocza (spadek cholesterolu całkowitego i frakcji LDL) [16]. Zaobserwowany został również stymulujący wpływ leczenia miejscowego ozonem na gojenie ran u chorej z kalcylfilaksją (zwapniającą arteriopatią mocznicową) [2]. Podczas ozonoterapii nie ulegają zmianie własności agregacyjne płytek krwi [19], krzepnięcie krwi [1] oraz funkcje endotelium [16]. Ponadto ozonoterapia nie ma wpływu na funkcję komórek NK i nie wpływa na odpowiedź zapalną (CRP, IL-6) [4, 18]. Co bardzo ważne, ozonoterapia nie stymuluje stresu oksydacyjnego [21]. Niezmieniona pozostaje również adekwatność dializy i funkcja przetoki dializacyjnej [17].

Szukając przyczyn poprawy klinicznej u pacjentów z PAOD wskazywano na poprawę parametrów reologicznych krwi po terapii ozonem [7, 11, 22]. Chcąc zweryfikować tę hipotezę przeprowadziliśmy badanie kontrolowane dotyczące wpływu pojedynczej dawki ozonu na zmiany płynności błony erytrocytarnej, która może z kolei prowadzić do łatwiejszego przechodzenia erytrocytów przez zwężone miażdżycą naczynia i prowadzić do lepszego ukrwienia i utlenowania tkanek.

Materiał i metody

Badaniem objęto 14 pacjentów przewlekłe HD (charakterystykę pacjentów podano w tabeli 1), u których nie stwierdzano cech stanu zapalnego, z wartościami hemoglobiny zgodnymi z zaleceniami w tej populacji (Hb=11-12 g/dl) i adekwatną dawką dializy (Kt/V>1,2). Przyczyną schyłkowej niewydolności nerek były: przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek (n=4), nefropatia nadciśnieniowa (n=2), nefropatia niedokrwienna (n=2), wielotorbiolowate zwyrodnienie nerek (n=2), cewkowo-śródmiąższowe zapalenie nerek (n=1), przyczyna nieznana (n=3). Żaden z pacjentów nie chorował na cukrzycę. PAOD zdiagnozowano na podstawie wypełnionego kwestionariusza upośledzenia chodzenia (walking impairment questionnaire), badania ultrasonograficznego lub angiograficznego. Wszyscy pacjenci mieli stabilne chromanie przestankowe (stadium II według Fontain'a), zdefiniowane jako ból w jednej lub obu nogach występujący po wysiłku i ustępujący po 10 minutach odpoczynku. Chromanie przestankowe uznano jako stabilne, jeżeli przez ostatnie 6 miesięcy nie uległo zmianie.

Pacjenci byli HD 3 razy w tygodniu przez 4-5 godzin z wykorzystaniem przetoki tętniczo-żylną, techniki dwuigłowej, dializy wodorowęglanowej, polisulfonowych dializatorów niskoprzepływowych. Przed rozpoczęciem każdej dializy pacjent otrzymywał heparynę (LMWH) drobnocząsteczkową (Fragmin®, Phizer Health AB, USA). Wszyscy pacjenci byli leczeni czynnikami stymulującymi erytropoezę (ESA).

Podawanie ozonu (duża autohemoterapia ozonowa - MAHTO3)

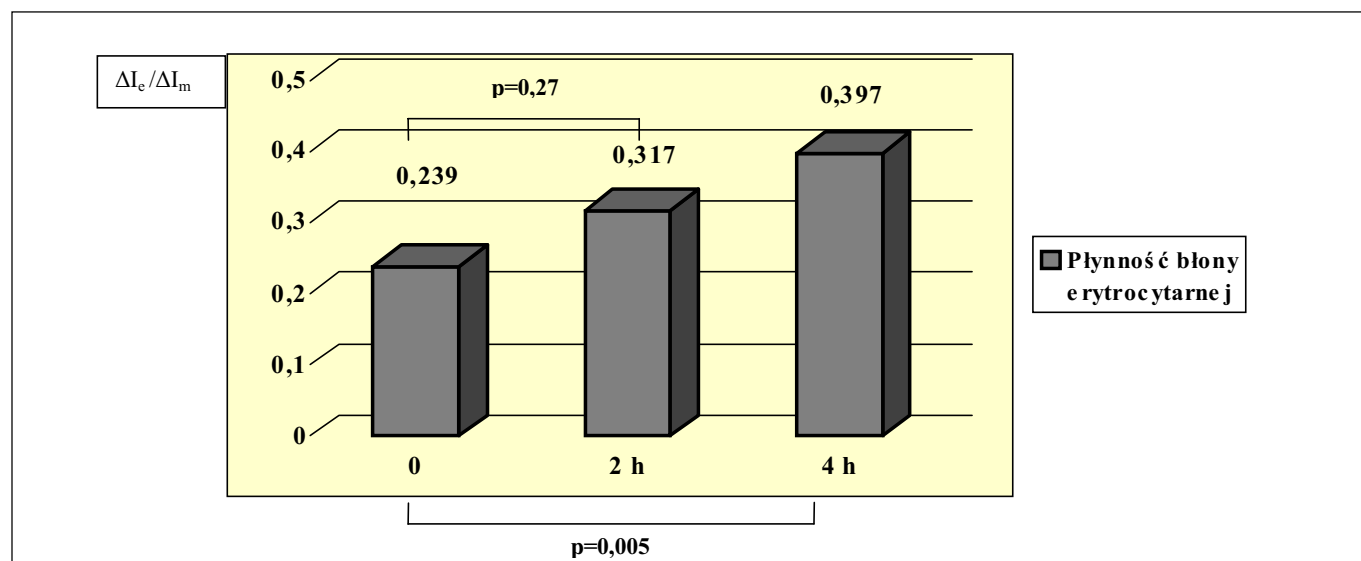
Zabieg leczenia za pomocą ozonu wykonano za pomocą techniki MAHTO3 zgodnie z wymaganiami Madryckiej Deklaracji Leczenia Ozonem [12]. Zabieg wykonywano po podłączeniu pacjenta do układu drenów dializacyjnych, przed rozpoczęciem HD i po podaniu antykoagulacji (LMWH). W tym celu 100 ml krwi pacjenta pobierano pod ciśnieniem do sterylnej, szklanej butelki (Ozonosan®, Dr J.Hänsler GmbH, Ifezheim, Germany) zawierającej roztwór antykoagulantu - cytrynianu sodu. Następnie w generatorze ozonu (ATO-3, Kriometrum, Warszawa, Polska) atestowanego przez Ministerstwo Zdrowia, produkowano 100 ml mieszaniny tlenowo-ozonowej o stężeniu ozonu 50 µg/ml (łączna dawka ozonu 5000 µg na zabieg) i z pomocą aseptycznej techniki podawano strzykawką i rozpuszczano we krwi pacjenta w butelce. Butelka była zaopatrzona w mikroperlator, który automatycznie, bez konieczności mieszania krwi w butelce, rozpuszczał ozon we krwi. Następnie ozonowana krew była podawana metodą kroplową za pomocą drenów podłączonych do igły dializacyjnej, którymi wcześniej była pobrana od pacjenta. Łączny czas trwania zabiegu MAHTO3 nie przekraczał 5 minut.

Podawanie tlenu (duża autohemoterapia z podaniem tlenu - MAHTO2)

Zabieg wykonywano tak samo jak w przypadku zabiegu MAHTO3. Różnicą było podanie 100 ml tlenu, zamiast 100 ml mieszaniny tlenowo-ozonowej.

Protokół badania

Badanie było przeprowadzone zgodnie z Deklaracją Helsińską. Badanie uzyskało zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Każdy pacjent udzielił świadomej zgody na wykonanie badania. Zaplanowano otwarte, randomizowane, kontrolowane badanie typu cross-over. Pacjenci w randomizowany sposób, w odstępach tygodniowych poddawani byli kolejno zabiegom: pierwszej kontroli - zabieg HD, drugiej kontroli - zabieg HD połączony z MAHTO2 oraz zabiegowi



Rycina 1

Wpływ zabiegu MAHTO3 na płynność błony erytrocytarnej ($\Delta I_e / \Delta I_m$).
The influence of MAHTO3 on erythrocyte's membrane fluidity ($\Delta I_e / \Delta I_m$).

Tabela I
Kliniczna i laboratoryjna charakterystyka pacjentów.
Clinical and laboratory characteristics of the patients.

Parametr	Wartości
Pacjenci (liczba)	14
Płeć (liczba K/M)	6/8
Wiek (lata)	61,14 ± 1,55 (55 - 74)
Czas leczenia hemodializą (miesiące)	78,07 ± 28,98 (6 - 365)
Hemoglobina (g/dl)	10,83 ± 0,17
CRP (mg/l)	4,07 ± 0,48
Kt/V	1,59 ± 0,07

Wyniki zostały przedstawione jako średnia ± standardowy błąd pomiaru (SEM) wraz z zakresem wyników.

Tabela II
Zmiana wartości płynności błony erytrocytarnej po zabiegu MAHTO3, MAHTO2 i zabiegu HD w stosunku do wartości wyjściowych ($\Delta le / \Delta lm4h - \Delta le / \Delta lm0h$).
Change of erythrocyte's membrane fluidity value after MAHTO3, MAHTO2 and HD session in comparison to baseline values ($\Delta le / \Delta lm4h - \Delta le / \Delta lm0h$).

Parametr	MAHTO3	MAHTO2	Zabieg HD
Zmiana wartości płynności błony erytrocytarnej ($\Delta le / \Delta lm4h - \Delta le / \Delta lm0h$)	0,157±0,05	-0,014±0,017	0,015±0,031

Wyniki zostały przedstawione jako średnia ± standardowy błąd pomiaru (SEM).
MAHTO3 vs MAHTO2 (p=0,002); MAHTO3 vs HD (p=0,02); MAHTO2 vs HD (p=0,39).

HD połączone z MAHTO3 (terapia badana). Zabiegi MAHTO3 i MAHTO2 przeprowadzone były tuż przed rozpoczęciem środkowego, drugiego w tygodniu zabiegu HD, po podaniu LMWH. Podczas wszystkich etapów badania (HD, MAHTO2, MAHTO3) pobierano 3 próbki krwi (przed rozpoczęciem procedury po 2 i 4 godzinach od jej rozpoczęcia) na oznaczenie $\Delta le / \Delta lm$.

Metody laboratoryjne

Uzyskanie błon erytrocytów

Pobrano 10 ml krwi na cytrynian (ACD), którą następnie wirowano przy 3000 obrotów/min przez 10 min w temp. 4°C. Usunięto osocze, erytrocyty przepłukano buforem fosforanowym (PBS) dwukrotnie. Zawieszono erytrocyty w buforze do końcowego hematokrytu 50%. Komórki hemolizowane były w 20 mM buforze fosforanowym EDTA (sól dwusodowa kwasu etylenodiaminoczerwocowego) i PMSF (fluorek fenylsulfonolu). Błony zawieszono w 5 mM buforze fosforanowym [8].

Oznaczenie płynności błon erytrocytów

Do 500 µl uprzednio przygotowanych błon erytrocytów dodano 10 µl znacznika DPyP (89 µM 1,3-di(1-pyrenylo)propan, przygotowany przez rozpuszczenie 2 mg DPyP w 50 ml etanolu). Próbę ślepą stanowiło 500 µl błon erytrocytów zawieszonych w 5 mM buforze fosforanowym bez dodanego znacznika. Próby badane i ślepe inkubowano w łaźni ultradźwiękowej w temperaturze pokojowej przez 10 minut, następnie wytrząsano przez 24 godziny w lodówce. Po dodaniu do objętości 3 ml 5 mM buforu fosforanowego, próby inkubowano w łaźni ultradźwiękowej w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Następnie mierzono próby badane i ślepe za pomocą spektrofлуorymetru Perkin-Elmer (LS 50B) przy długości fali wzbudzenia 329 nm i dwóch długościach fali emisji: monomeru: 379 nm (Im) i excimeru: 480 nm (Ie). W celu obliczenia płynności błony dokonano obliczeń. W tym celu pomiar próby badanej przy długości fali emisji monomeru 379 nm (Im) pomniejszono o wartość próby ślepej uzyskując różnicę (Δlm). Następnie pomiar próby badanej przy długości fali emisji excimeru 480 nm (Ie) pomniejszono o wartość próby ślepej uzyskując różnicę (Δle). Wskaźnik stosunku Δle do Δlm wskazuje na płynność

błon erytrocytów ($\Delta le / \Delta lm$) - im ten stosunek jest wyższy, tym płynność błony erytrocytarnej jest wyższa [13].

Statystyka

Dane prezentowane są w pracy jako średnia ± standardowy błąd pomiaru. Analizy normalności zmiennych dokonano przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Zmiany płynności błony erytrocytarnej obliczane były przy pomocy analizy wariancji (ANOVA) z procedurą post-hoc Bonferroni. P<0,05 (dwuogoniaste) traktowano jako znamienne statystycznie. Analizy dokonano przy pomocy programu STATISTICA® wersja 9.0 (StatSoft Inc.).

Wyniki

W trakcie przeprowadzonego badania stwierdzono statystycznie znamienne wzrost płynności błony erytrocytarnej po 4 godzinie od zabiegu MAHTO3. Stwierdzony po 2 godzinach wzrost nie był statystycznie znamienne (rycina 1). Zmianę wartości płynności erytrocytów po 4 godzinach od momentu przeprowadzenia zabiegu (HD, MAHTO2, MAHTO3), w stosunku do wartości wyjściowych ($\Delta le / \Delta lm4h - \Delta le / \Delta lm0h$) przedstawiono w tabeli II. Stwierdzono statystycznie znamienne wzrost wartości $\Delta le / \Delta lm4h - \Delta le / \Delta lm0h$ po zabiegu MAHTO3 w stosunku do kontroli: zabiegu HD (0,157 ± 0,05 vs 0,015 ± 0,031; p=0,02) i MAHTO2 (0,157 ± 0,05 vs -0,014 ± 0,017; p=0,002). Nie stwierdzono natomiast statystycznie znamiennej różnicy między badaniami kontrolnymi, tzn. między MAHTO2 a zabiegiem HD (-0,014 ± 0,017 vs 0,015 ± 0,04; p=0,39).

Dyskusja

Schyłkowa niewydolność nerek oraz zabiegi HD mogą prowadzić do niekorzystnych zmian składu i funkcji błony erytrocytów. Zabieg HD wpływa na niekorzystną zmianę składu wolnych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład błony erytrocytarnej prowadząc do ich większej sztywności i wzrostu indeksu sztywności erytrocytów [9,15], aktywację wolnych rodników i utratę antyoksydantów [10], zwiększoną kruchość i wysokie prawdopodobieństwo rozpadu erytrocytów [6]. Może to prowadzić do

pogorszenia własności reologicznych krwi pod wpływem zabiegu HD, co w połączeniu z miażdżycą tętnic znacznie zwiększa ryzyko rozwoju zmian niedokrwiennych. Wcześniejsze badania z zastosowaniem MAHTO3 wykazały, że ozon może poprawiać własności reologiczne krwi (spadek lepkości krwi, wzrost przesączalności krwi oraz spadek stężenia fibrynogenu) u pacjentów z PAOD bez niewydolności nerek [7, 11, 22]. Wynik obecnego badania wskazuje, że pojedynczy zabieg MAHTO3 wpływa na wzrost płynności błony erytrocytarnej pacjentów hemodializowanych z PAOD. Zastosowanie podwójnej kontroli potwierdziło, że wzrost ten jest skutkiem podania ozonu, a nie następstwem procedur związanych z dializą lub podaniem tlenu. Poprawa płynności błony erytrocyta może przyczyniać się do większej jej odkształcalności i ułatwiać przechodzenie erytrocytów przez zwężone tętnice. Może to prowadzić do obserwowanego w naszych poprzednich badaniach wydłużenia przechodzonego dystansu bez chromania przestankowego. Z drugiej strony zwiększenie płynności błony erytrocytów może wpływać na zwiększone ryzyko uszkodzenia błony erytrocytarnej i hemolizy. W świetle przeprowadzonych wcześniej badań zastosowanie ozonu w dawkach do 80 µg/ml jest jednak bezpieczne i nie powoduje wystąpienia hemolizy [5]. Przeprowadzone przez nas inne badania nad wpływem leczenia ozonem wskazują, że nie prowadzi on również do aktywacji procesów oksydacyjnych, co mogłoby prowadzić do zmian składu i funkcji błony erytrocytarnej [21]. Wynik przeprowadzonego badania po raz kolejny wskazuje na możliwość korzystnego, leczniczego działania ozonu. Aczkolwiek, w badaniu naszym widać tylko działanie pojedynczego zabiegu ozonowania krwi powodującego wzrost płynności błony erytrocytarnej. Przeprowadzenie badania kontrolowanego po zastosowaniu pełnego cyklu leczenia wskaże, czy zabiegi MAHTO3 wpływają na dłuższy i trwalszy wzrost płynności błon erytrocytów pacjentów HD.

Piśmiennictwo

1. Biedunkiewicz B., Lizakowski S., Tylicki L. et al.:

- Blood coagulation unaffected by ozonated autohemo-therapy in patients on maintenance hemodialysis. *Arch. Med. Res.* 2006, 37, 1034.
2. **Biedunkiewicz B., Tylicki L., Lichodziejewska-Niemierko M. et al.:** Ozonotherapy in a dialyzed patient with calcific uremic arteriopathy. *Kidney Int.* 2003, 64, 367.
 3. **Biedunkiewicz B., Tylicki L., Nieweglowski T. et al.:** Clinical efficacy of ozonated autohemotherapy in hemodialyzed patients with intermittent claudication: an oxygen-controlled study. *Int. J. Artif. Organs.* 2004, 27, 29.
 4. **Biedunkiewicz B., Tylicki L., Rachon D. et al.:** Natural killer cell activity unaffected by ozonated autohemotherapy in patients with end-stage renal disease on maintenance renal replacement therapy. *Int. J. Artif. Organs.* 2004, 27, 766.
 5. **Bocci V.:** Scientific and medical aspects of ozone therapy. *State of art. Arch. Med. Res.* 2006, 23, 181.
 6. **Brzeszczynska J., Luciak M., Gwozdziński K.:** Alterations of erythrocyte structure and cellular susceptibility in patients with chronic renal failure: effect of haemodialysis and oxidative stress. *Free Radic. Res.* 2008, 42, 40.
 7. **Coppola L., Verazzo G., Giunta R. et al.:** Oxygen-ozone therapy and hemorheological parameters in peripheral chronic arterial occlusive disease. *Thromb. Atheroscler.* 1992, 3, 83.
 8. **Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J. et al.:** The preparation and chemical characteristics of hemoglobin - free ghost of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1963, 100, 119.
 9. **Dolegowska B., Kwiatkowska E., Wesolowska T. et al.:** Effect of hemodialysis on the content of fatty acids in monolayers of erythrocyte membranes in patients with chronic renal failure. *Ren. Fail.* 2007, 29, 447.
 10. **Goi G., Massaccesi L., Baquero Herrera C.J. et al.:** Oxidative stress in elderly chronic renal failure patients: effects of renal replacement therapies on cell membrane fluidity. *J. Nephrol.* 2009, 22, 630.
 11. **Giunta R., Coppola A., Luongo C. et al.:** Ozonized autohemotransfusion improves hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease. *Ann. Hematol.* 2001, 80, 745.
 12. **International Meeting of Ozone Therapy Schools:** Madrid declaration on ozone therapy, Madrid, Spain 2010.
 13. **Mejia R., Gomez-Eichelman M.C., Fernandez M.S. et al.:** Escherichia coli membrane fluidity as detected by excimerization of dipyrrenylopropane: sensitivity to the bacterial fatty acid profile. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, 368, 156.
 14. **O'Hare A., Johansen K.:** Lower-extremity peripheral arterial disease among patients with end-stage renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001, 12, 2838.
 15. **Sotiakopoulos N., Tsitsios T., Stambolidou M. et al.:** The red blood cell deformability in patients suffering from end stage renal failure on hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ren. Fail.* 2004, 26, 179.
 16. **Tylicki L., Biedunkiewicz B., Nieweglowski T. et al.:** Ozonated autohemotherapy in patients on maintenance hemodialysis: influence on lipid profile and endothelium. *Artif. Organs* 2004, 28, 234.
 17. **Tylicki L., Biedunkiewicz B., Nieweglowski T. et al.:** Fistula function and dialysis adequacy during ozonotherapy in chronically hemodialyzed patients. *Artif. Organs* 2004, 28, 513.
 18. **Tylicki L., Biedunkiewicz B., Rachon D. et al.:** No effects of ozonated autohemotherapy on inflammation response in hemodialyzed patients. *Med. Inflamm.* 2004, 13, 377.
 19. **Tylicki L., Lizakowski S., Biedunkiewicz B. et al.:** Platelet function unaffected by ozonated autohemotherapy in chronically haemodialysed patients. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2004, 15, 619.
 20. **Tylicki L., Nieweglowski T., Biedunkiewicz B. et al.:** Beneficial clinical effects of ozonated autohemotherapy in chronically dialysed patients with atherosclerotic ischemia of the lower limbs - pilot study. *Int. J. Artif. Organs* 2001, 24, 79.
 21. **Tylicki L., Nieweglowski T., Biedunkiewicz B. et al.:** The influence of ozonated autohemotherapy on oxidative stress in hemodialyzed patients with atherosclerotic ischemia of lower limbs. *Int. J. Artif. Organs* 2003, 26, 297.
 22. **Verazzo G., Coppola L., Luongo C. et al.:** Hyperbaric oxygen, oxygen-ozone therapy, and rheologic parameters of blood in patients with peripheral occlusive arterial disease. *Undersea Hyperbar. Med.* 1995, 22, 17.