

## Ocena stężeń midkine u pacjentów po zabiegu transplantacji nerki

Midkine jest to zasadowy czynnik wzrostowy wiążący się z heparyną. Jego ekspresja istotnie wzrasta w stanach zapalnych. Ma on własności plejotropowe wykazuje aktywność w czasie proliferacji komórek, migracji, angiogenezy i fibrynolizy. Celem naszych badań było zbadanie stężeń midkine u pacjentów po zabiegu transplantacji nerki w zależności od towarzyszącego nadciśnienia oraz rodzaju leczenia hipotensyjnego. Badaniami objęto 21 pacjentów po zabiegu przeszczepienia nerki (Tx). Stężenie midkine było oceniane metodą ELISA przy pomocy gotowych zestawów komercyjnych. Parametry oceniające funkcje śródbłonna i stężenie midkine były istotnie statystycznie wyższe niż w grupie kontrolnej. Stężenie midkine wykazywało istotnie statystycznie korelacje z NT-proBNP ( $r=-0,46$ ,  $p<0,05$ ), CD44 ( $r=0,45$ ,  $p<0,05$ ), hematokrytem ( $r=-0,51$ ,  $p<0,01$ ) oraz liczbą erytrocytów ( $r=-0,57$ ,  $p<0,01$ ). Nie wykazano natomiast różnic w stężeniu midkine u pacjentów leczonych lekami blokującymi układ renina-angiotensyna-aldosteron, ani też różnic w stężeniu midkine u pacjentów z prawidłowo kontrolowanym ciśnieniem tętniczym w porównaniu do chorych z nadciśnieniem. Stężenie midkine u osób po zabiegu transplantacji nerki z eGFR powyżej 60 ml/min ( $n=13$ ) było istotnie niższe niż w grupie z eGFR poniżej 60 ml/min, podobnie u pacjentów z klasą I i II NYHA stężenie midkine było istotnie niższe niż w grupie chorych z klasą NYHA III. Podwyższone stężenie midkine u pacjentów po zabiegu transplantacji nerki może być wynikiem upośledzonej funkcji nerek i/lub układu krążenia. Natomiast rola midkine w rozwoju i progresji powikłań sercowo-naczyniowych, w tym nadciśnienia, w tej grupie chorych wymaga dalszych badań. (NEFROL. DIAL. POL. 2012, 16, 161-163)

Ewa KOC-ŻÓRAWSKA

Jolanta MAŁYSZKO

Jacek S. MAŁYSZKO

Michał MYŚLIWIEC

Klinika Nefrologii i Transplantologii  
z Ośrodkiem Dializ UM w Białymstoku  
Kierownik Kliniki: Prof. Michał Myśliwiec

**Słowa kluczowe:**

- midkine
- transplantacja nerki
- śródbłonek
- funkcja nerek

**Key words:**

- midkine
- kidney transplantation
- endothelium
- kidney function

### Midkine levels in kidney allograft recipients

The 13-kDa midkine is a heparin-binding growth factor with various functions ranging from cell growth and survival to angiogenesis, repair, and inflammation. The aim of the study was to assess midkine levels in 21 kidney allograft recipients in relation to blood pressure and type of hypotensive therapy. Midkine levels was studied using commercially available ELISA assay. Markers of endothelial dysfunction and midkine were significantly higher in kidney allograft recipients when compared to the healthy volunteers. Midkine was related to NT-proBNP ( $r=-0,46$ ,  $p<0,05$ ), CD44 ( $r=0,45$ ,  $p<0,05$ ), hematocrit ( $r=-0,51$ ,  $p<0,01$ ) and erythrocyte count ( $r=-0,57$ ,  $p<0,01$ ). There was no difference in midkine in patients with good control of blood pressure when compared to hypertensive ones, as well as between treated with renin-angiotensin-aldosterone system blockade relative to non-treated. Midkine levels in patients with eGFR over 60 ml/min ( $n=13$ ) was significantly lower than in patients with eGFR below 60 ml/min, similarly in patients NYHA class I and II midkine was significantly lower than NYHA class III. Elevated midkine levels in patients after kidney transplantation may be related to impaired kidney function as well as heart failure. However, the potential role of midkine in the pathogenesis of cardiovascular complications, including hypertension in this population requires further studies. (NEPHROL. DIAL. POL. 2012, 16, 161-163)

**Wstęp**

Jedną z dwóch podstawowych metod leczenia schyłkowej przewlekłej niewydolności nerek jest przeszczepienie nerki pobranej od innej osoby. Dobre wyniki tej metody leczenia schyłkowej niewydolności nerek są wynikiem postępu w leczeniu zapobiegającym odrzucaniu przeszczepu. Stosowanie leków immunosupresyjnych obciążone jest licznymi powikłaniami, m. in.: zwiększoną wrażliwością na zakażenia, częstszym wy-

stępowaniem nowotworów, uszkodzeniem szpiku, oraz wzrostem powikłań zakrzepowych. Prawidłowa hemostaza jest wynikiem równowagi pomiędzy czynnikami krzepnięcia i ich inhibitorami. Zachwianie tej delikatnej i precyzyjnej równowagi prowadzi do zagrażających życiu krwawień czy zakrzepów, dlatego jej utrzymanie jest tak istotne. Zaburzenia hemostazy wiążą się nierozdzielnie z zaburzeniami funkcji śródbłonna, zaś uszkodzenie śródbłonna może także

**Adres do korespondencji:**

Ewa Koc-Żórawska  
Klinika Nefrologii i Transplantologii  
z Ośrodkiem Dializ UM w Białymstoku  
15-540 Białystok, ul. Żurawia 14  
tel.: 85-7434-586  
e-mail: ewakoczorawska@wp.pl

przyczynić się do przyspieszonego rozwoju miażdżycy w tej grupie chorych. Badania własne [14], jak i inne [22] wskazują na obecność stanu nadkrzepliwości u chorych po zabiegu transplantacji nerki.

Midkine jest to zasadowy czynnik wzrostowy wiążący się z heparyną. Jego ekspresja istotnie wzrasta w stanach zapalnych. Ma on własności plejotropowe, wykazuje aktywność w czasie proliferacji komórek, migracji, angiogenezy i fibrylizacji [6-9, 13, 15, 16, 25]. W 2009 roku *Hobo* i wsp. [4] wykazali wzrost stężenie midkine u myszy z doświadczalnie wywołaną niewydolnością nerek z towarzyszącym nadciśnieniem. W badaniach *in vitro* prowadzonych przez tych samych badaczy wykazali oni, iż u myszy z brakiem midkine (midkine-deficient mice) nie obserwowano tak istotnego uszkodzenia nerek oraz rozwoju nadciśnienia pomimo zastosowania modelu doświadczalnej niewydolności nerek (5/6 nefrektomii). Podanie midkine tym myszom spowodowało rozwój nadciśnienia i przywróciło ekspresję enzymu konwertującego-ACE. Podanie inhibitora enzymu konwertującego czy sartanu przejawiało się działaniem hipotensyjnym u myszy i obniżeniem stężenia angiotensyny II w osoczu. Wiadomo, iż układ RAA reguluje ciśnienie tętnicze krwi i bierze udział patogenezie różnych chorób nerek. Celem naszych badań była ocena stężeń midkine u pacjentów po zabiegu transplantacji nerki oraz potencjalnych korelacji pomiędzy stężeniem midkine a dysfunkcją śródbłonna ocenianą poprzez stężenie czynnika von Willebranda, cytokiny adhezyjnej - ICAM, markerów stanu zapalnego-CRP i IL-6 jak też rodzajem leczenia hipotensyjnego (stosowanie ACEi/ARB).

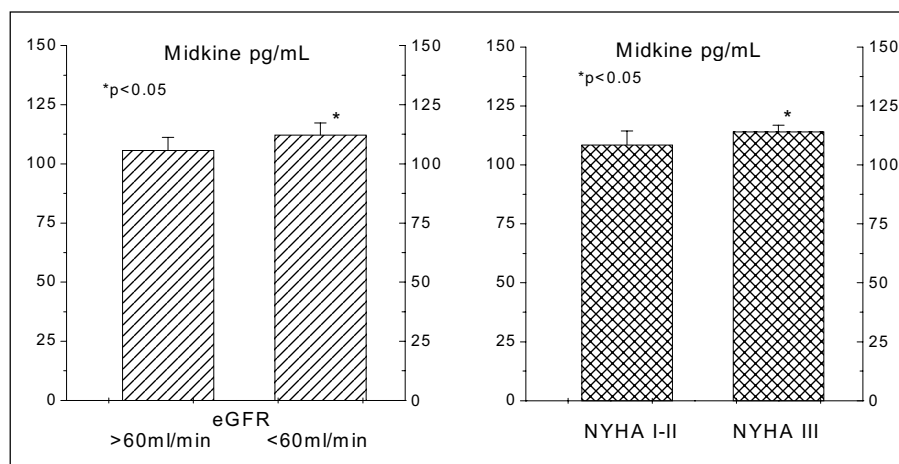
#### Materiał i metody

Badaniami objęto 21 pacjentów (6 kobiet i 15 mężczyzn) w wieku 26-63 lat, będących 1-10 lat po zabiegu przeszczepienia nerki (Tx). Pacjenci przed transplantacją leczenia byli dializami przez okres 1-9 (średnio 3) lat. Przyczyny schyłkowej niewydolności nerek to: kłębuszkowe zapalenie nerek (n=16), zwyrodnienie wielotorbielowe nerek (n=4), cewkowo-śródmiąższowe zapalenie nerek (n=1). Wartości kreatyniny były stabilne w okresie poprzedzającym badanie. W żadnym przypadku nie występował niedawny incydent ostrego odrzucania nerki przeszczepionej. Wszyscy chorzy otrzymywali prednizon w dawce 5-12,5 (średnio 7±1) mg/d, cyklosporynę w dawce 125-500 (średnio 136±57) mg/d, azatioprynę w dawce 50-150 mg/d lub mykofenolan mofetylu w dawce 2 g/d. Krew była pobierana podczas rutynowej wizyty w Poradni Transplantacji Nerek bez stazy, następnie odwirowywana (2500 g przez 15 minut), a surowica była przechowywana do czasu oznaczeń w temp. -80°C. Do oznaczeń markerów funkcji śródbłonna krew była pobierana do próbek zawierających 3.8% cytrynianu sodu, następnie odwirowywana (2500 g przez 15 minut), a osocze było przechowywane do czasu oznaczeń w temp. -80°C. Grupę kontrolną stanowiło 21 zdrowych ochotników, głównie personel medyczny, jego rodziny i znajomi. Dostępnymi komercyjnie zestawami oznaczano hsCRP (American Diagnostica, Greenwich, CT, USA), CD44 (DRG R&D Quantikine, Abingdon, UK), vWF (American Diagnostica, Gre-

**Tabela I**  
Charakterystyka kliniczna badanych grup pacjentów.  
Clinical characteristics of the studied groups.

	Grupa kontrolna [N=22]	Pacjenci po transplantacji nerki [N =21]
Wiek (lata)	45 ± 14	42 ± 11
Czas po Tx (m-ce)	-	37 ± 36
Hemoglobina (g/dL)	14,3 ± 2,1	13,9 ± 1,6
Hematokryt (%)	44,6 ± 4,1	41,9 ± 4,8
Liczba erytrocytów (x 106/ml)	4,62 ± 0,78	4,41 ± 0,57
Białko całkowite (g/L)	7,24 ± 0,89	7,18± 0,84
Cholesterol (mg/dL)	172,9 ± 40,8	186,8 ± 44,6
Triglicerydy (mg/dL)	98,8 ± 45,8	136,9 ± 76,2
Kreatynina (mg/dL)	0,86 ± 0,22	1,52± 0,66
eGFR -MDRD (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	92,6 ± 19,6	57,0 ± 18,9
hsCRP (mg/L)	0,44 (0.15; 0.81)	1,21 (0.59; 3.17) ***
CD44 (ng/mL)	571,9 ± 282,2	740,1 ± 196,3***
CD146 (ng/mL)	117,8 ± 103,1	242,4 ± 118,2**
vWF (%)	87,2 ± 17,6	167,4 ± 30,6***
VCAM (ng/mL)	470,3 ± 200,2	637,5 ± 510,7**
ICAM (ng/mL)	73,5 (23; 120)	235,2 (207,6; 299,4) ***
NT-proBNP (pg/mL)	53,7 ± 27,2	233,2 ± 156,8
Midkine (pg/mL)	75,3 ± 10,5	109,5 ± 5,6**

Wartości podane jako średnie ± SD, lub mediana i kwartyle p<0,5, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001



**Rycina 1**  
Stężenie midkine w zależności of eGFR i klasy NYHA u pacjentów po zabiegu transplantacji nerki  
Midkine levels in regard to eGFR and NYHA class in kidney allograft recipients

enwich, CT, USA), VCAM (R&D Quantikine, Abingdon, UK), ICAM (R&D Quantikine, Abingdon, UK), CD146 (Biocytex, Marseille, Francja), NT-proBNP (USCN Life, China) metodą ELISA. Stężenie midkine było oznaczane gotowymi zestawami firmy BioVendor, Brno, Czechy. Pozostałe parametry jak hematokryt, liczba erytrocytów, stężenie hemoglobiny, cholesterolu, triglicerydów, białka całkowitego, albuminy, CRP (jako badanie przesiewowe testem o niskiej czułości), kreatyniny, badano w centralnym laboratorium przy pomocy standardowych metod. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego Statistica 8.0 PL dla Windows (Tulsa, OK, USA). Uzyskane dane wyrażono jako średnią arytmetyczną ± odchylenie średnie lub medianę i kwartyle zakresy. Normalność rozkładu sprawdzano przy pomocy testu

Shapiro-Wilka. Jeżeli istniała możliwość to zmienne o rozkładzie innym niż normalny logarytmowano, aby uzyskać rozkład normalny (hsCRP). W celu oceny istotności statystycznej stosowano test t-Studenta dla zmiennych o rozkładzie normalnym, dla zmiennych o rozkładzie innym niż normalny Mann-Whitney'a. W każdym przypadku za poziom istotności statystycznej przyjęto p<0,05. Między poszczególnymi parametrami dokonano analizy korelacji wykorzystując współczynniki korelacji Pearsona lub Spearmana.

#### Wyniki

Badane parametry kliniczne i biochemiczne zostały przedstawione w tabeli I. Parametry określające funkcję śródbłonna były istotnie statystycznie wyższe niż w grupie kontrolnej, podobnie jak stężenie midki-

ne. Stężenie kreatyniny też było istotnie wyższe u pacjentów po zabiegu transplantacji nerki. Stężenie midkine wykazywało istotne statystycznie korelacje z NT-proBNP ( $r=-0,46$ ,  $p<0,05$ ), CD44 ( $r=0,45$ ,  $p<0,05$ ), hematokrytem ( $r=-0,51$ ,  $p<0,01$ ), liczbą erytrocytów ( $r=-0,57$ ,  $p<0,01$ ). Nie wykazano natomiast różnic w stężeniu midkine u pacjentów leczonych lekami blokującymi układ renina-angiotensyna-aldosteron ( $n=10$ ), ani też różnic w stężeniu midkine u pacjentów z prawidłowo kontrolowanym ciśnieniem tętniczym w porównaniu do chorych z nadciśnieniem. Natomiast, gdy podzielono pacjentów na stadia przewlekłej choroby nerek, stężenie midkine u osób po transplantacji nerki z eGFR powyżej 60 ml/min ( $n=13$ ) było istotnie niższe niż w grupie z eGFR poniżej 60 ml/min podobnie u pacjentów z klasą I i II NYHA stężenie midkine było istotnie niższe niż w grupie chorych z klasą NYHA III (rycina 1)

### Dyskusja

W dostępnym piśmiennictwie brak jest prac dotyczących zarówno stężenia midkine w populacji pacjentów po zabiegu transplantacji nerki jak też wpływu rodzaju leczenia hipotensyjnego na stężenie midkine u pacjentów. W grupie chorych po transplantacji nerki wykazano, iż stężenie midkine było istotnie wyższe niż u zdrowych ochotników. Ponadto, stężenie midkine było istotnie wyższe w grupie pacjentów z eGFR poniżej 60ml/min, oraz z klasą III NYHA. Pomimo dramatycznej poprawy w krótkoterminowym przeżyciu pacjentów i przeszczepu, częstość późnych niewydolności graftu zmieniła się tylko w niewielkim stopniu na przestrzeni ostatniego ćwierćwiecza. W efekcie postępu w przeszczepianiu nerek i prowadzeniu chorych po transplantacji, śmiertelność zmniejszyła się istotnie w latach 60 i 80-tych ubiegłego wieku głównie z powodu spadku ilości zgonów spowodowanych powikłaniami infekcyjnymi [3]. Jednakże, w tym samym czasie wzrosła śmiertelność z powodów sercowo-naczyniowych [3]. W konsekwencji w kolejnych latach ilość zgonów pozostawała na stałym poziomie. Zgon z funkcjonującym przeszczepem (głównie z powodów sercowo-naczyniowych) jest główną przyczyną utraty przeszczepu, zaś choroby układu sercowo-naczyniowego są wiodącą przyczyną śmierci u pacjentów po zabiegu transplantacji nerki [17, 24]. Kiberd i wsp. [10] wykazali, iż zarówno kardiomiopatia (asymptomatyczny przerost lewej komory serca czy klinicznie objawowa zastoinowa niewydolność serca) oraz choroba niedokrwienna serca są istotnymi powikłaniami u pacjentów po zabiegu transplantacji nerki, są one także istotnie częstsze niż w populacji ogólnej. Rigatto i wsp. [19] w 2002 roku w grupie 638 pacjentów po zabiegu transplantacji nerki z 2 ośrodków kanadyjskich oceniali ryzyko niewydolności serca. W analizie jednoczynnikowej ryzyko niewydolności serca de novo wzrosło o 28% (95% CI 14-39%) na każdy spadek klirensu kreatyniny wynoszący 10ml/min. Jednakże w analizie wieloczynnikowej tylko stężenie hemoglobiny, wiek i

cukrzyca były niezależnymi predyktorami rozwoju niewydolności serca. W badaniach z udziałem pacjentów po zabiegu transplantacji serca wykazano, iż stężenie midkine było istotnie wyższe u pacjentów z wyższą klasą NYHA, zaś predyktorem stężenia midkine w analizie wieloczynnikowej było stężenie cystatyny C oraz NT-proBNP [18]. Zatem, zarówno funkcja nerek jak i wydolność układu krążenia oceniana stężeniem NT-proBNP miały istotny wpływ na stężenie tej plejotropowej cytokiny. Kitahara i wsp. [11] opisali też wzrost stężenia midkine w niewydolności serca. U pacjentów po zabiegu transplantacji nerki częstość występowania nadciśnienia tętniczego wynosi od 50 do 90%, szczególnie często w grupie otrzymującej inhibitory kalcyneuryny [26, 27]. Kosugi i Sato [12] przedstawili koncepcję udziału midkine w regulacji ciśnienia tętniczego krwi poprzez aktywację układu RAA opierając się na badaniach eksperymentalnych [1, 2]. W obecnej pracy nie wykazano różnic w stężeniu midkine w zależności od współistnienia nadciśnienia tętniczego czy stosowania leków blokujących układ RAA. Uważa się, iż midkine indukuje ekspresję enzymu konwertującego angiotensynę w śródbłonku naczyniowym [2]. Ponadto, midkine powoduje nasilenie stanu zapalnego poprzez promowanie migracji leukocytów zapalnych [5, 20, 21], poprzez syntezę chemokin [20] i supresję regulatorowych limfocytów T [23]. Poprzez nasilenie tej odpowiedzi zapalnej midkine mogłaby przyczyniać się zarówno do rozwoju jak i progresji zmian w sercu i nerkach. W badaniach własnych nie wykazano jednakże korelacji pomiędzy stężeniem midkine a markerami funkcji śródbłonka czy stanu zapalnego.

### Ograniczenia badania

Podsumowując, podwyższone stężenie midkine u pacjentów po zabiegu transplantacji nerki może być wynikiem upośledzonej funkcji nerek i/lub układu krążenia. Natomiast rola midkine w rozwoju i progresji powikłań sercowo-naczyniowych, w tym nadciśnienia, w tej grupie chorych wymaga dalszych badań.

### Piśmiennictwo

1. Bicik Z., Bahcebası T., Kulaksizoglu S. et al.: The efficacy of cystatin C assay in the prediction of glomerular filtration rate. Is it a more reliable marker for renal failure? *Clin. Chem. Lab. Med.* 2005, 43, 855.
2. Ezquerro L., Herradon G., Nguyen T. et al.: Midkine is a newly discovered regulator of the renin-angiotensin pathway in mouse aorta: significance of the pleiotrophin/midkine developmental gene family in angiotensin II signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 333, 636.
3. Hill M.N., Grossman R.A., Feldman H.I. et al.: Changes in causes of death after renal transplantation, 1966 to 1987. *Am. J. Kidney Dis.* 1991, 17, 512.
4. Hobo A., Yuzawa Y., Kosugi T. et al.: The growth factor midkine regulates the renin-angiotensin system in mice. *J. Clin. Invest.* 2009, 119, 1616.
5. Horiba M., Kadomatsu K., Nakamura E. et al.: Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 2000, 105, 489.
6. Ikematsu S., Nakagawara A., Nakamura Y. et al.: Correlation of elevated level of blood midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas. *Br. J. Cancer* 2003, 88, 1522.

7. Ikematsu S., Yano A., Aridome K. et al.: Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas. *Br. J. Cancer* 2000, 83, 701.
8. Ireson C.R., Kelland L.R.: Discovery and development of anticancer aptamers. *Mol. Cancer Ther.* 2006, 5, 2957.
9. Kato M., Maeta H., Kato S. et al.: Immunohistochemical and in situ hybridization analyses of midkine expression in thyroid papillary carcinoma. *Mod. Pathol.* 2000, 13, 1060.
10. Kiberd B., Keough-Ryan T., Panek R.: Cardiovascular disease reduction in the outpatient kidney transplant clinic. *Am. J. Transplant.* 2003, 3, 1393.
11. Kitahara T., Shishido T., Suzuki S. et al.: Serum midkine as a predictor of cardiac events in patients with chronic heart failure. *J. Card. Fail.* 2010, 16, 308.
12. Kosugi T., Sato W.: Midkine and the kidney: healthy and disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2012, 27, 16.
13. Lavie Y., Cao H., Volner A. et al.: Agents that reverse multidrug resistance, tamoxifen, verapamil, and cyclosporin A., block glycosphingolipid metabolism by inhibiting ceramide glycosylation in human cancer cells. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 1682.
14. Malyszko J., Malyszko J.S., Pawlak K. et al.: Coagulo-lytic system and endothelial function in cyclosporine-treated kidney allograft recipients. *Transplantation* 1996, 62, 828.
15. Mirkin B.L., Clark S., Zheng X. et al.: Identification of midkine as a mediator for intercellular transfer of drug resistance. *Oncogene* 2005, 24, 4965.
16. Muramatsu T.: Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J. Biochem.* 2002, 132, 359.
17. Ojo A.O.: Cardiovascular complications after renal transplantation and their prevention. *Transplantation* 2006; 82, 603.
18. Przybylowski P., Malyszko J., Malyszko J.S.: Serum Midkine Is Related to NYHA Class and Cystatin C in Heart Transplant Recipients. *Transplant. Proc.* 2010, 42, 3704.
19. Rigatto C., Parfrey P., Foley R. et al.: Congestive heart failure in renal transplant recipients: risk factors, outcomes, and relationship with ischemic heart disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, 13, 1084.
20. Sato W., Kadomatsu K., Yuzawa Y. et al.: Midkine is involved neutrophil infiltration into the tubulo-interstitium in ischemic renal injury. *J. Immunol.* 2001, 167, 3463.
21. Takada T., Toriyama K., Muramatsu H. et al.: Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis. *J. Biochem.* 1997, 122, 453.
22. Vanrenterghem Y., Roels L., Lerut T. et al.: Thromboembolic complications and haemostatic changes in cyclosporine treated cadaveric kidney allograft recipients. *Lancet* 1985, 1, 999.
23. Wang J., Takeuchi H., Sonobe Y. et al.: Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through the expansion of regulatory T cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 3915.
24. Yeo F.E., Villines T.C., Bucci J.R. et al.: Cardiovascular risk in stage 4 and 5 nephropathy. *Adv. Chronic Kidney Dis.* 2004, 11, 116.
25. Yusa K., Tsuruo T.: Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells. *Cancer Res.* 1989, 49, 5002.
26. Zbroch E., Glowinska I., Maciorkowska D. et al.: Blood pressure control in kidney transplant recipients. *Arterial Hypertens.* 2011, 5, 283.
27. Zbroch E., Malyszko J., Mysliwiec M. et al.: Hypertension after solid Hypertension in solid organ transplant recipients. *Ann. Transplant.* 2012, 1, 100.