

**Gdański Uniwersytet Medyczny**

**Michał Chmielewski**

**Mechanizmy i znaczenie kliniczne  
zaburzeń lipidowych  
w przewlekłej chorobie nerek**

Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik: prof. dr hab. med. Bolesław Rutkowski

**Gdańsk 2011**

Wydano za zgodą Senackiej Komisji Wydawnictw  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Wydawca: Gdański Uniwersytet Medyczny  
Druk: Dział Wydawnictw GUMed  
Gdański, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a  
Zlecenie KW/272/11

# Spis treści

YKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW .....	5
YKAZ PRAC BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY .....	6
1. WSTĘP .....	7
1.1. Definicja i epidemiologia przewlekłej choroby nerek (PChN) .....	7
1.2. Dotychczasowy stan wiedzy na temat zaburzeń lipidowych w PChN .....	8
2. CELE PRACY .....	11
3. MATERIAŁ I METODYKA .....	12
3.1. Wyjaśnienie mechanizmów prowadzących do zaburzeń biosyntezy cholesterolu w doświadczalnej PChN .....	12
3.2. Ocena roli receptora zmiatającego CD36 w patogenezie zaburzeń lipidowych i w postępie procesu miażdżycowego pacjentów z PChN .....	13
3.3. Ocena wpływu zmienności genetycznej na profil lipidowy pacjentów z PChN .....	14
3.4. Ocena wpływu zaburzeń lipidowych na śmiertelność pacjentów z PChN .....	14
4. OMÓWIENIE WYNIKÓW .....	16
4.1. Wyjaśnienie mechanizmów prowadzących do zaburzeń biosyntezy cholesterolu w doświadczalnej PChN .....	16
4.2. Rola receptora zmiatającego CD36 w patogenezie zaburzeń lipidowych i w postępie procesu miażdżycowego pacjentów z PChN .....	17
4.3. Wpływ zmienności genetycznej na profil lipidowy pacjentów z PChN .....	19
4.4. Wpływ zaburzeń lipidowych na śmiertelność pacjentów z PChN .....	20
5. WNIOSKI .....	24
6. PIŚMIENNICTWO .....	25
7. PRACE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY .....	31



## Wykaz używanych skrótów

- ACAT – *acylCoA:cholesterol acyltransferase* / acylotrasferaza acylo-CoA:cholesterol
- CETP – *cholesterol ester transfer protein* / białko przenoszące estry cholesterolu
- ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay* / test immunoenzymatyczny
- GFR – *glomerular filtration rate* / wartość filtracji kłębuszkowej
- HDL – *high density lipoproteins* / lipoproteiny o dużej gęstości
- HL – *hepatic lipase* / lipaza wątrobowa
- HMG-CoA – *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA* / 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymA
- HDL – *high density lipoproteins* / lipoproteiny o dużej gęstości
- IDL – *intermediate density lipoproteins* / lipoproteiny o pośredniej gęstości
- LCAT – *lecithin cholesterol acyltransferase* / acyltransferaza lecytynowo-cholesterolowa
- LDL – *low density lipoproteins* / lipoproteiny o małej gęstości
- LPL – *lipoprotein lipase* / lipaza lipoproteinowa
- PChN – przewlekła choroba nerek
- SNP – *single nucleotide polymorphism* / polimorfizm pojedynczego nukleotydu
- SREBP-2 – *sterol regulatory element – binding protein-2* / białko wiążące element regulujący sterole-2
- VLDL – *very low density lipoproteins* / lipoproteiny o bardzo małej gęstości

## Wykaz prac będących przedmiotem rozprawy

1. **Chmielewski M.**, Sucajtyś-Szulc E., Kossowska E., Świerczyński J., Rutkowski B., Bogusławski W.: Increased gene expression of liver SREBP-2 in experimental chronic renal failure. *Atherosclerosis* 2007, 191, 326-332. [IF 4,29]
2. **Chmielewski M.**, Sucajtyś-Szulc E., Kossowska E., Świerczyński J., Rutkowski B., Bogusławski W.: Feedback inhibition of cholesterol biosynthesis by dietary cholesterol in experimental chronic renal failure. *J. Ren. Nutr.* 2008, 18, 5, 448-455. [IF 1,20]
3. **Chmielewski M.**, Bryl E., Marzec Ł., Aleksandrowicz E., Witkowski J.M., Rutkowski B.: Expression of scavenger receptor CD36 in chronic renal failure patients. *Artif. Organs* 2005, 29, 8, 608-614. [IF 1,95]
4. **Chmielewski M.**, Bragfors-Helin A.C., Lindholm B., Stenvinkel P., Anderstam B.: Serum soluble CD36, assessed by a novel monoclonal antibody-based sandwich ELISA, predicts cardiovascular mortality in dialysis patients. *Clin. Chim. Acta* 2010, 411, 23-24, 2079-2082. [IF 2,39]
5. **Chmielewski M.**, Stenvinkel P., Luttrupp K., Suliman M.E., Qureshi A.R., Carrero J.J., Barany P., Heimbürger O., Nordfors L., Lindholm B.: Lipoprotein lipase 1595 C/G and hepatic lipase -480 C/T polymorphisms : impact on lipid profile in incident dialysis patients. *Blood Purif.* 2008, 26, 6, 555-560. [IF 1,75]
6. **Chmielewski M.**, Carrero J.J., Qureshi A.R., Axelsson J., Heimbürger O., Berglund L., Bárány P., Rutkowski B., Lindholm B., Stenvinkel P.: Temporal discrepancies in the association between the apoB/apoA-I ratio and mortality in incident dialysis patients. *J. Intern. Med.* 2009, 265, 6, 708-716. [IF 5,94]
7. **Chmielewski M.**, Verduijn M., Drechsler C., Lindholm B., Stenvinkel P., Rutkowski B., Boeschoten E.W., Krediet R.T., Dekker F.W.: Low cholesterol in dialysis patients – causal risk factor for mortality or an effect of confounding? *Nephrol. Dial. Transplant.* 2011, 26, 3325-3331. [IF 3,56]

# 1. Wstęp

## 1.1. Definicja i epidemiologia przewlekłej choroby nerek (PChN)

Mianem przewlekłej choroby nerek (PChN) określa się grupę schorzeń, które spełniają jedno z dwóch kryteriów przedstawionych poniżej:

- strukturalne lub czynnościowe uszkodzenie nerek utrzymujące się dłużej niż trzy miesiące, objawiające się zmianami morfologicznymi lub wskaźnikami uszkodzenia nerek w badaniach krwi, moczu i/lub w badaniach obrazowych,
- zmniejszenie filtracji kłębuszkowej poniżej 60 ml/min utrzymujące się dłużej niż trzy miesiące.

Klasyfikację PChN, wg NKF (National Kidney Foundation) przedstawiono w tabeli 1 [33].

Tabela 1 Klasyfikacja PChN wg NKF (National Kidney Foundation)

Stadium PChN	GFR (ml/min/1,73 m <sup>2</sup> powierzchni ciała)	Tradycyjna nazwa
1	>90	Uszkodzenie nerek
2	60-89	Utajona niewydolność nerek
3	30-59	Wyrównana niewydolność nerek
4	15-29	Niewyrównana niewydolność nerek
5	<15	Schyłkowa niewydolność nerek

PChN – przewlekła choroba nerek, GFR (*glomerular filtration rate*) – wartość filtracji kłębuszkowej

Do najczęstszych przyczyn PChN należą: cukrzyca (zarówno 1 jak i 2 typu), pierwotne kłębuszkowe zapalenia nerek i nadciśnienie tętnicze [46]. Badania epidemiologiczne ostatnich lat wskazują, że PChN jest znacznie częstsza, niż do tej pory sądzono [44]. Różnego stopnia uszkodzenie nerek dotyczy bowiem ok. 6-15% populacji ogólnej. W Polsce, na podstawie wyników epidemiologicznego badania pilotażowego przeprowadzonego na Pomorzu Gdańskim (PolNef), odsetek osób z PChN sięga niemal 12% [31]. Oznacza to, że problem PChN dotyczy ponad 4 milionów Polaków. Z tych szacunkowych danych wynika, że PChN, jak również związane z nią zaburzenia metaboliczne, stanowią istotny problem epidemiologiczny.

## **1.2. Dotychczasowy stan wiedzy na temat zaburzeń lipidowych w PChN**

Zaburzenia lipidowe są stałym elementem PChN [45]. Nieznaczne w początkowych stadiach choroby nerek, ulegają nasileniu wraz z postępem podstawowego schorzenia. Do najczęstszych należą hipertriglicydemia i obniżone stężenie cholesterolu lipoprotein o dużej gęstości, HDL (*high density lipoproteins*). Stężenie triglicerydów rośnie już we wczesnych stadiach PChN, a w zaawansowanej chorobie znaczna hipertriglicydemia dotyczy nawet 70% pacjentów. Leczenie nerkozastępcze ma niewielki wpływ na to powikłanie, chociaż według niektórych autorów hemodializa może prowadzić do obniżenia poziomu triglicerydów [11], natomiast dializa otrzewnowa, na skutek przewlekłego obciążenia glukozą, wiąże się często z nasileniem hipertriglicydemii [42]. Wysokiemu stężeniu triglicerydów towarzyszy podwyższony poziom apolipoproteiny B, a także lipoprotein bogatych w triglicerydy: o bardzo małej i pośredniej gęstości (VLDL – *very low density lipoproteins*, IDL – *intermediate density lipoproteins*). Hipertriglicydemia jest wynikiem dwóch procesów: zwiększonej syntezy i ograniczonego usuwania triglicerydów z krążenia. Badania, przeprowadzone między innymi w ośrodku gdańskim, wskazują, że większe znaczenie w patogenezie hipertriglicydemii ma zmniejszenie klirensu triglicerydów [3, 47, 51]. Jest ono, w głównej mierze, wynikiem zmniejszenia aktywności enzymów odpowiedzialnych za lipolizę: lipazy lipoproteinowej (LPL – *lipoprotein lipase*) i wątrobowej (HL – *hepatic lipase*) [47]. Dodatkowo, w toku PChN dochodzi do zmniejszenia ekspresji receptorów biorących udział w usuwaniu lipoprotein VLDL z krążenia [26, 52].

Zaburzenia aktywności enzymatycznej w PChN wydają się być główną przyczyną obniżonego stężenia cholesterolu HDL. Wśród nich należy wymienić niską aktywność acyltransferazy lecytynowo-cholesterolowej (LCAT - *lecithin cholesterol acyltransferase*), odpowiedzialnej za estryfikację cholesterolu pobranego przez lipoproteiny HDL [38], a także podwyższoną aktywność białka przenoszącego estry cholesterolu (CETP - *cholesterol ester transfer protein*) [27] i acylotrasferazy acylo-CoA:cholesterol (ACAT – *acylCoA:cholesterol acyltransferase*) [34]. Pewne znaczenie kliniczne ma najprawdopodobniej niskie stężenie paraoksonazy, enzymu związanego z lipoproteinami HDL o silnych właściwościach antyoksydacyjnych [10].

Stężenie całkowitego cholesterolu, jak również jego frakcji LDL (*low density lipoproteins*), jest z reguły prawidłowe [4]. Z hipercholesterolemią mamy do czynienia jedynie u 20-30% pacjentów z PChN. W badaniach, będących podstawą pracy doktorskiej, wykazano, że główną przyczyną hipercholesterolemii w doświadczalnej PChN jest nasilenie syntezy cholesterolu [6]. Stwierdzono również, że za wzrost ten odpowiedzialna jest zwiększona synteza i aktywność reduktazy HMG-CoA (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA*), podstawowego enzymu na szlaku cholesterologenezy, odpowiedzialnego za szybkość całego procesu [7].

Należy wspomnieć, że u niedożywionych, czy wyniszczonych pacjentów ze schyłkową PChN stężenie cholesterolu całkowitego, a także jego frakcji LDL, może być nawet obniżone [36]. Stężenie cholesterolu zwykle wzrasta po rozpoczęciu dializoterapii otrzewnowej, jako następstwo obciążenia glukozą [42]. Po przeszczepieniu nerki hipercholesterolemia jest zjawiskiem bardzo częstym [18, 28]. Jest to, w głównej mierze, konsekwencja leczenia immunosupresyjnego, przede wszystkim stosowania cyklosporyny, steroidów i sirolimusu [9, 16].

Niezależnie od poziomu cholesterolu frakcji LDL, PChN prowadzi do zmian w strukturze cząsteczki tej lipoproteiny. Lipoproteiny LDL stają się mniejsze i bardziej gęste, w porównaniu z lipoproteinami populacji ogólnej [40]. Co więcej, w związku z nasilonym stresem oksydacyjnym, typowym powikłaniem PChN, cząsteczki LDL podlegają utlenieniu (peroksydacji). Przestają być rozpoznawane przez receptory LDL. Z osocza usuwane są przez receptory zmiatające (*scavenger receptors*) znajdujące się na powierzchni monocytów/makrofagów. Przeładowane lipidami komórki przekształcają się w komórki piankowate, których powstanie stanowi wczesny, kluczowy etap w postępie procesu miażdżycowego [1, 2].

Należy wspomnieć, że stężenie lipoproteiny (a) jest podwyższone w PChN, zwłaszcza wśród pacjentów z zespołem nerczycowym i tych leczonych dializą otrzewnową. Jest to najprawdopodobniej spowodowane znaczną utratą białka do moczu, lub płynu dializacyjnego i związaną z tym nasiloną produkcją apolipoprotein [21, 32, 50].

Hipertriglicerydemia, hipercholesterolemia, niski poziom cholesterolu HDL, oksydacyjne modyfikacje lipoprotein stanowią istotne czynniki ryzyka rozwoju schorzeń sercowo-naczyniowych i śmiertelności w populacji ogólnej. Wśród pacjentów z PChN, zwłaszcza w jej schyłkowej fazie, nie wykazano takich zależności, a liczne badania wskazują nawet na związek między hiperlipidemią a lepszą przeżywalnością chorych z PChN [19, 23, 25, 30, 37]. Co więcej, wieloośrodkowe badania nad użyciem leków obniżających stężenie lipidów nie wykazały ich wpływu na przeżycie pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek [17, 54].

Celem prac przedstawionych poniżej jest poszerzenie dotychczasowej wiedzy na temat zaburzeń lipidowych w PChN i próba oceny ich znaczenia klinicznego u pacjentów w schyłkowej fazie choroby, wymagających leczenia nerkozastępczego.

## 2. Cele pracy

1. Wyjaśnienie mechanizmów prowadzących do zaburzeń biosyntezy cholesterolu w doświadczalnej PChN
  - rola czynnika transkrypcyjnego SREBP-2
  - wpływ diety na syntezę i stężenie cholesterolu
  
2. Ocena roli receptora zmiatającego CD36 w patogenezie zaburzeń lipidowych i w postępie procesu miażdżycowego pacjentów z PChN
  - ekspresja CD36 na monocytach krwi pacjentów z PChN
  - opracowanie nowatorskiej metody oceny stężenia rozpuszczalnej formy CD36 (sCD36)
  - sCD36 u pacjentów z PChN jako marker ryzyka sercowo-naczyniowego
  
3. Ocena wpływu zmienności genetycznej na profil lipidowy pacjentów z PChN
  - wpływ wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu na zaburzenia lipidowe w PChN
  
4. Ocena wpływu zaburzeń lipidowych na śmiertelność pacjentów z PChN
  - zagadnienie „paradoksu czynników ryzyka” w populacji PChN
  - weryfikacja hipotezy „różnicy czasowej konkurujących czynników ryzyka”
  - zastosowanie „randomizacji mendlowskiej” dla wyjaśnienia związków pomiędzy stężeniem cholesterolu a śmiertelnością wśród pacjentów z PChN

## 3. Materiał i metodyka

### 3.1. Wyjaśnienie mechanizmów prowadzących do zaburzeń biosyntezy cholesterolu w doświadczalnej PChN

- Rola czynnika transkrypcyjnego SREBP-2 [praca 1]
- Wpływ diety na syntezę i stężenie cholesterolu [praca 2]

Badanie doświadczalne przedstawione w pracach 1 i 2 zostały zatwierdzone przez Niezależną Komisję Bioetyczną do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdańskim Uniwersytecie Medycznym). Badania przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar, które na początku doświadczeń miały 8-9 tygodni i ważyły 230-250 g. Cykl dobowy regulowany był 12-godzinnym oświetleniem pomieszczenia, w którym przebywały zwierzęta. Doświadczalną PChN wywoływano poprzez subtotalną nefrektomię, przeprowadzaną w dwóch etapach. Podczas pierwszego zabiegu usuwano jedną nerkę, a po dwóch tygodniach przeprowadzano drugi zabieg, w czasie którego usuwano 2/3 nerki drugiej. Właściwe doświadczenia przeprowadzano po 5-6 tygodniach od drugiego zabiegu.

Przewlekłą chorobę nerek potwierdzano oznaczeniem stężenia mocznika i kreatyniny. W pracy nr 2 zwierzęta podzielono na cztery grupy, po dwie szczurów zdrowych i z PChN. W jednej grupie zwierząt kontrolnych i w jednej zwierząt chorych zastosowano trzydniową dietę bogatocholesterolową, natomiast pozostałe dwie grupy były karmione dietą normocholesterolową, jak dotychczas.

Zwierzętom, przed dekapitacją, podawano dootrzewnowo wodę trytowaną, a syntezę cholesterolu *in vivo* oceniano na podstawie wbudowywania trytu w nowopowstały cholesterol. Cholesterologenezę badano również *in vitro* poprzez inkubację skrawków wątroby w środowisku ze znakowanymi kwasem octowym i mewalonianem, prekursorami cholesterolu. Ponadto oceniano ekspresję i aktywność reduktazy HMG-CoA, enzymu determinującego prędkość całego procesu cholesterologenezy oraz ekspresję genu i ilość białka SREBP-2 (*sterol regulatory element – binding protein 2*), czynnika transkrypcyjnego, który, między innymi poprzez kontrolę aktywności reduktazy HMG-CoA, reguluje biosyntezę cholesterolu.

### **3.2. Ocena roli receptora zmiatającego CD36 w patogenezie zaburzeń lipidowych i w postępie procesu miażdżycowego pacjentów z PChN**

- **Ekspresja CD36 na monocytach pacjentów z PChN [praca 3]**
- **Opracowanie nowatorskiej metody oceny stężenia rozpuszczalnej formy CD36 (sCD36) [praca 4]**
- **sCD36 u pacjentów z PChN jako marker ryzyka sercowo-naczyniowego [praca 4]**

Badanie oceniające ekspresję receptora zmiatającego CD36 na monocytach krwi [praca 3] przeprowadzono na grupie 24 pacjentów hemodializowanych, 11 chorych leczonych dializą otrzewnową, 13 pacjentów z PChN w stadium przeddializacyjnym oraz 15 zdrowych ochotników dobranych pod kątem wieku i płci. Zgodę na badanie nr 3 wydała Niezależna Komisja Bioetyczna do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdańskim Uniwersytecie Medycznym). Jako że znany jest wpływ cukrzycy na ekspresję CD36, pacjentów z cukrzycą wykluczono z badania. Przyczyną PChN w badanych grupach były przede wszystkim pierwotne glomerulopatie i nadciśnienie tętnicze. Ilość białka CD36 oceniano immunofluorescencyjnie z pomocą cytometrii przepływowej. Dodatkowo w surowicach pacjentów i u zdrowych ochotników badano nasilenie stresu oksydacyjnego poprzez ocenę stężenia wskaźników peroksydacji lipidów, malonyldialdehydu i 4-hydroksyalenu.

Badanie mające na celu opracowanie metody oceny rozpuszczalnej formy receptora CD36 (sCD36) w surowicy przeprowadzono na grupie 228 pacjentów rozpoczynających leczenie nerkozastępcze (szwedzka kohorta MIA). Grupę kontrolną stanowiło 73 ochotników dobranych pod względem płci i wieku. Zgodę na badanie nr 4, jak również na badania nr 5 i 6, wydała Komisja Bioetyczna przy Instytucie Karolinska w Sztokholmie (Szwecja). Białko sCD36 oceniano przy użyciu immunoenzymatycznego testu podwójnego wiązania (*sandwich ELISA*). Metodę udoskonalano poprzez liczne powtórzenia z różnymi stężeniami poszczególnych przeciwciał. Pacjenci pozostawali w obserwacji przez 36 miesięcy. W tym czasie odnotowano 24 zgony z przyczyn sercowo-naczyniowych. Analizę przeżycia przeprowadzono z użyciem metody Kaplana-Meiera oraz metody proporcjonalnego hazardu Coxa.

### **3.3. Ocena wpływu zmienności genetycznej na profil lipidowy pacjentów z PChN**

- **Wpływ wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu na zaburzenia lipidowe w PChN [praca 5]**

Badaniem objęto grupę 293 pacjentów rozpoczynających leczenie nerkozastępcze (szwedzka kohorta MIA). Najczęstszymi przyczynami PChN w badanej grupie były cukrzyca i pierwotne glomerulopatie. Ocenie poddano 10 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP – *single nucleotide polymorphism*) o znanym wpływie na profil lipidowy w populacji ogólnej. Polimorfizmy badano po amplifikacji DNA łańcuchową reakcją polimerazy (PCR – *polymerase chain reaction*) przy użyciu sekwencjonowania DNA metodą Pyrosequencing. W badaniu określono częstość występowania badanych polimorfizmów, w porównaniu z populacją ogólną, a także ich wpływ na profil lipidowy i na przeżywalność dializowanych pacjentów.

### **3.4. Ocena wpływu zaburzeń lipidowych na śmiertelność pacjentów z PChN**

- **Zagadnienie „paradoksu czynników ryzyka” w populacji PChN [praca 6 i 7]**
- **Weryfikacja hipotezy „różnicy czasowej konkurujących czynników ryzyka” [praca 6 i 7]**
- **Zastosowanie „randomizacji mendlowskiej” dla wyjaśnienia związków pomiędzy stężeniem cholesterolu a śmiertelnością wśród pacjentów z PChN [praca 7]**

Badania składające się na pracę 6 objęły grupę 391 pacjentów rozpoczynających leczenie nerkozastępcze (kohorta MIA). Oceniano zależność pomiędzy zaburzeniami lipidowymi, reprezentowanymi przez współczynnik apoB/apoA-I, a przeżywalnością pacjentów dializowanych. Analizę przeżycia przeprowadzono z użyciem metody Kaplana-Meiera oraz metody proporcjonalnego hazardu Coxa. W celu oszacowania wpływu okresu obserwacji na badane zależności posłużono się metodą stratyfikacji czasowej w analizie Coxa (*time*

*stratified Cox analysis*) [12]. Według tej metody śmiertelność w pierwszym roku dializoterapii dla całej badanej populacji porównywano ze śmiertelnością w kolejnych trzech latach leczenia nerkozastępczego dla pacjentów którzy przeżyli pierwszy rok dializoterapii.

Badanie opisane w pracy 7 przeprowadzone zostało na grupie 1191 pacjentów rozpoczynających dializoterapię (holenderska kohorta NECOSAD). Zgodę na badanie nr 7 wydały lokalne komisje bioetyczne ośrodków biorących udział w badaniu. Oceniano zależność pomiędzy stężeniem całkowitego cholesterolu osocza, a ryzykiem zgonu pacjentów w obserwacji pięcioletniej. Również w tym badaniu zastosowano metodę stratyfikacji czasowej analizy Coxa oceniając badane związki w kolejnych latach dializoterapii. Aby wyeliminować ewentualny wpływ czynników zakłócających (*confounding factors*) na badane zależności posłużono się epidemiologiczną metodą „randomizacji mendlowskiej” [55]. Wg tej metody zbadano występowanie polimorfizmu genetycznego apoE w badanej populacji, a następnie oceniono wzajemne zależności pomiędzy polimorfizmem, poziomem cholesterolu a przeżywalnością pacjentów z PChN.

## 4. Omówienie wyników

### 4.1. Wyjaśnienie mechanizmów prowadzących do zaburzeń biosyntezy cholesterolu w doświadczalnej PChN

Badania przeprowadzone w ośrodku gdańskim wykazały, że główną przyczyną hipercholesterolemii towarzyszącej doświadczalnej PChN jest nasilona biosynteza cholesterolu [6, 7]. Czynnikiem determinującym szybkość tego procesu jest aktywność reduktazy HMG-CoA. W kolejnym cyklu badań udokumentowano znaczny wzrost ekspresji genu reduktazy HMG-CoA, jak również zwiększenie poziomu i aktywności tego enzymu w doświadczalnej PChN [7]. Wiadomym jest, że zarówno ekspresja genu, ilość i aktywność reduktazy HMG-CoA determinowane są aktywnością jądrowego czynnika transkrypcyjnego, nazwanego SREBP-2 [8]. Czynnikiem ten jest białkiem błonowym związanym z retikulum endoplazmatycznym [22]. W sytuacji niskiego stężenia cholesterolu wewnątrz komórki, SREBP-2 zostaje przemieszczony do aparatu Golgiego, gdzie ulega aktywacji. Aktywowany czynnik przenika do jądra komórkowego, łączy się z odpowiednimi sekwencjami w obrębie promotorów genów kodujących enzymy biorące udział w procesie cholesterologenezy i aktywuje ich transkrypcję. Z tego powodu SREBP-2 uznawany jest za kluczowy czynnik w regulacji homeostazy cholesterolowej ustroju. Kolejnym etapem badań nad przyczynami wysokiego stężenia cholesterolu w doświadczalnej PChN było więc oznaczenie ekspresji genetycznej i ilości tego czynnika [**praca 1**]. Badania przeprowadzono na szczurzym modelu PChN (model nefrektomii 5/6). Wykazano, że doświadczalna PChN związana jest ze znacznym wzrostem mRNA i białka SREBP-2 w wątrobach zwierząt z PChN. Stwierdzono znamienne większą ilość zarówno formy prekursorowej SREBP-2, jak i aktywowanej. Wzrostowi temu towarzyszyła nasilona aktywność reduktazy HMG-CoA i znaczna intensyfikacja całego procesu cholesterologenezy. W hepatocytach chorych zwierząt stwierdzono również podwyższone stężenie cholesterolu. Uzyskane wyniki były o tyle zaskakujące, że wysokie stężenie wewnątrzkomórkowego cholesterolu jest, w warunkach fizjologii, czynnikiem blokującym cholesterologenezę na zasadzie zwrotnego sprzężenia. Na tej zasadzie oparte jest hamowanie endogennej syntezy cholesterolu poprzez cholesterol zawarty w pożywieniu. Tymczasem, w hepatocytach szczurów z doświadczalną PChN,

biosynteza cholesterolu była bardzo aktywna, pomimo wysokiego stężenia wewnątrzkomórkowego. Obserwacje te zadecydowały o kształcie kolejnych eksperymentów, w których badano wpływ diety bogatocholesterolowej na proces cholesterologenezy w doświadczalnej PChN [**praca 2**]. Wykazano, że mechanizm hamowania biosyntezy cholesterolu przez cholesterol egzogeny jest zachowany w doświadczalnej PChN. Dieta wzbogacona w cholesterol miała bowiem znaczny wpływ na zahamowanie aktywności czynnika transkrypcyjnego SREBP-2, reduktazy HMG-CoA, jak i całego procesu cholesterologenezy, mierzonej zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.

W przeprowadzonym cyklu badań zaobserwowano również zmniejszoną ilość białka receptora LDL. Receptor ten odpowiedzialny jest za usuwanie z krążenia lipoprotein o dużej zawartości cholesterolu. Zmniejszenie jego ilości wiązać się zatem powinno ze spadkiem klirensu osoczowego cholesterolu.

W podsumowaniu, wyniki badań przedstawionych powyżej charakteryzują mechanizmy prowadzące do hipercholesterolemii w doświadczalnej PChN. Głównym mechanizmem wydaje się być wzmożona synteza cholesterolu, determinowana bezpośrednio nasileniem aktywności reduktazy HMG-CoA, a pośrednio aktywnością jądrowego czynnika transkrypcyjnego SREBP-2. Pewne znaczenie ma także upośledzone usuwanie cholesterolu z krążenia, za czym przemawia zmniejszenie ilości receptora LDL w wątrobach szczurów z PChN, w porównaniu ze zwierzętami zdrowymi.

## **4.2. Rola receptora zmiatającego CD36 w patogenezie zaburzeń lipidowych i w postępie procesu miażdżycowego pacjentów z PChN**

Charakter zaburzeń lipidowych w doświadczalnej PChN jest w znacznej mierze różny od obserwowanego u pacjentów z tym schorzeniem. Przewlekła choroba nerek w modelach zwierzęcych charakteryzuje się, w głównej mierze, ilościowymi zaburzeniami stężenia lipidów, u pacjentów natomiast główną rolę pełnią omówione we Wstępie jakościowe zaburzenia w strukturze lipoprotein [5]. Jak wspomniano, małe gęste cząsteczki LDL ulegają peroksydacji, a usuwane są z krążenia przez receptory zmiatające monocytów/makrofagów (*scavenger receptors*). W przeciwieństwie do receptorów LDL, ilość receptorów zmiatających nie jest regulowana stężeniem wewnątrzkomórkowego cholesterolu. W związku z tym

monocyty/makrofagi pobierają lipoproteiny w sposób niekontrolowany, co doprowadza do przeładowania komórek lipidami i powstania komórek piankowatych. Stanowią one wczesny, kluczowy etap rozwoju blaszki miażdżycowej. Wiedza na temat receptorów zmiatających w PChN była dotychczas skąpa. Tak więc celem kolejnej pracy było oznaczenie ekspresji genetycznej i ilości podstawowego receptora zmiatającego (CD36) na powierzchni monocytów/makrofagów pacjentów z PChN [**praca 3**]. Receptor CD36 jest glikozylowanym białkiem o masie cząsteczkowej około 88 kDa, składającym się z 471 aminokwasów [49]. Białko zidentyfikowano ponad 30 lat temu, jednak dopiero w latach 90-tych stwierdzono jego właściwości receptora zmiatającego [14]. Od tego czasu, na podstawie licznych badań doświadczalnych i klinicznych, wielokrotnie potwierdzono podstawowe znaczenie tego receptora w usuwaniu zmienionych oksydacyjnie cząsteczek LDL i w procesie progresji miażdżycy [15, 39, 41]. Badanie przeprowadzono wśród pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek, leczonych hemodializą lub dializą otrzewnową, a także wśród pacjentów we wcześniejszych stadiach PChN. Grupę kontrolną stanowili dobrani pod względem płci i wieku zdrowi ochotnicy. Wykazano znacząco większy poziom mRNA i ilość białka receptora CD36 w grupie pacjentów leczonych nerkozastępczo, w porównaniu z osobami bez PChN. Ekspresja CD36 była również podwyższona wśród chorych znajdujących się we wcześniejszych stadiach PChN, choć w stopniu mniejszym, niż u pacjentów leczonych dializami. Nie jest jasne, czy wyższy poziom CD36 wśród chorych leczonych nerkozastępczo wynika ze znacznego zaawansowania niewydolności nerek, czy z wpływu samej dializoterapii. We wcześniejszych badaniach stwierdzono zwiększoną ekspresję innego receptora zmiatającego (SR-A) u chorych hemodializowanych przy użyciu błon kuprowanowych, w porównaniu z pacjentami dializowanymi przy pomocy błon polimetakrylowych [29]. Natomiast zwiększenie ekspresji CD36 u pacjentów leczonych dializą otrzewnową może być następstwem znacznego ładunku glukozy, na jaki narażeni są ci chorzy. Wzrost poziomu CD36 stwierdzono zarówno u pacjentów z cukrzycą, jak i u zdrowych ludzi po obciążeniu glukozą [48]. W niniejszej pracy stwierdzono ponadto znaczący wzrost wskaźników peroksydacji lipidów, zarówno u chorych dializowanych, jak i u pacjentów na wcześniejszych etapach PChN. Łącznie z podwyższonym poziomem CD36 świadczy to najprawdopodobniej o zwiększonym ryzyku rozwoju miażdżycy w tej grupie pacjentów. Receptor CD36 jest bowiem postrzegany jako potencjalnie przydatny wskaźnik ryzyka miażdżycy. Szerszemu stosowaniu go w praktyce klinicznej na przeszkodzie stały do tej pory trudności metodologiczne, a mianowicie konieczność izolowania komórek krwi, jako że CD36 oznaczany jest na ich powierzchni. Niedawno jednak wykazano obecność

osoczowej, rozpuszczalnej formy CD36 (*soluble CD36* – sCD36) [20]. Możliwość ilościowego oznaczania tej cząsteczki mogłaby być przydatna w ocenie ryzyka rozwoju procesu miażdżycowego. Z tego powodu cykl kolejnych badań poświęcony był opracowaniu metody oceny sCD36 [praca 4]. Wypracowano immunoenzymatyczny test podwójnego wiązania (*sandwich-ELISA*), którego przydatność w ilościowym oznaczaniu sCD36 zweryfikowano licznymi próbami optymalizującymi. Przy użyciu testu oznaczono stężenie sCD36 w grupie 228 pacjentów rozpoczynających leczenia nerkozastępcze, a także w grupie 73 zdrowych ochotników. Wykazano podwyższone stężenie sCD36 wśród pacjentów z PChN, w porównaniu z populacją ogólną. W grupie kontrolnej stwierdzono istnienie zależności pomiędzy stężeniem sCD36 a stopniem przesączania kłębuszkowego. Zaobserwowano również zależności pomiędzy sCD36, a obecnością cukrzycy, stosowaniem leczenia hipolipemizującego, a także śmiertelnością sercowo-naczyniową w obserwacji 3-letniej. Głównym osiągnięciem tego cyklu badań było pierwsze w świecie ilościowe oznaczenie sCD36 oraz wykazanie jego potencjalnej przydatności jako wskaźnika ryzyka sercowo-naczyniowego.

### **4.3. Wpływ zmienności genetycznej na profil lipidowy pacjentów z PChN**

Zaburzenia lipidowe w populacji ogólnej są w znacznej mierze zdeterminowane genetycznie. Natomiast wśród pacjentów z PChN wpływ zmienności genetycznej na profil lipidowy nie był do tej pory systematycznie badany. Celem kolejnego cyklu badań było częściowe wypełnienie tej luki. W populacji 293 pacjentów rozpoczynających leczenie nerkozastępcze zbadano 10 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP – *single nucleotide polymorphism*), o których wiadomo, że mają wpływ na stężenie lipidów w populacji ogólnej. Potwierdzono podobną częstość występowania badanych polimorfizmów w badanej populacji, w porównaniu z populacją ogólną. Wśród nich, dla dwóch (LPL 1595 C/G, HL – 480 C/T) potwierdzono ich znaczący wpływ na stężenie triglicerydów i lipoprotein HDL [praca 5].

LPL 1595 C/G jest polimorfizmem pojedynczego nukleotydu znajdującym się w obrębie genu kodującego lipazę lipoproteinową. Enzym ten odpowiedzialny jest za hydrolizę triglicerydów obecnych w lipoproteinach osocza. Polimorfizm LPL 1595 C/G występuje u ok. 20% populacji ogólnej. Powoduje on powstanie białka, w którym brak jest seryny i glicyny na

karboksylowym końcu enzymu. Tak zmieniona lipaza lipoproteinowa charakteryzuje się zwiększoną aktywnością enzymatyczną, co prowadzi do niższego poziomu triglicerydów i wyższego stężenia cholesterolu HDL, w porównaniu z populacją ogólną.

Polimorfizm HL –480 C/T dotyczy genu kodującego lipazę wątrobową. Enzym ten nasila usuwanie lipoprotein z krążenia, a także, podobnie jak lipaza lipoproteinowa, katalizuje rozkład triglicerydów. Również ten polimorfizm, występujący u ponad 40% populacji ogólnej, wiąże się z podwyższeniem poziomu cholesterolu HDL.

Warto nadmienić, że PChN prowadzi do znaczącego obniżenia aktywności obu enzymów.

W badaniach przeprowadzonych wśród pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek wykazano podobną, jak w populacji ogólnej, częstotliwość występowania badanych polimorfizmów, jak również podobny ich wpływ na profil lipidowy. Stwierdzono mianowicie znacząco niższy poziom triglicerydów w surowicach pacjentów z polimorfizmem LPL 1595 C/G, jak również wyższe stężenie cholesterolu HDL u nosicieli polimorfizmu HL –480 C/T. U 163 pacjentów profil lipidowy został oznaczony ponownie po 12 miesiącach dializoterapii. Jednakże w tej grupie nie stwierdzono żadnych zależności pomiędzy stężeniem triglicerydów, cholesterolu HDL a badanymi polimorfizmami. Świadczy to najprawdopodobniej o znaczącym wpływie mocznicy i/lub dializoterapii na profil lipidowy chorych z PChN, przewyższającym skromny wpływ pojedynczych polimorfizmów genetycznych.

Pacjentów obserwowano przez 5 lat leczenia nerkozastępczego, nie stwierdzono jednak żadnych zależności pomiędzy występowaniem badanych polimorfizmów a śmiertelnością ogólną, bądź sercowo-naczyniową.

#### **4.4. Wpływ zaburzeń lipidowych na śmiertelność pacjentów z PChN**

Jak wspomniano powyżej, zależność pomiędzy stężeniem cholesterolu a śmiertelnością, także tą sercowo-naczyniową, jest znacznie mniej wyraźna u pacjentów z PChN, w porównaniu z populacją ogólną. Wyniki licznych badań przeprowadzonych w tej grupie chorych, zwłaszcza wśród pacjentów hemodializowanych, wskazują, że cholesterol nie ma widocznego wpływu na ryzyko sercowo-naczyniowe, bądź że wpływ ten jest odwrotny od obserwowanego w populacji ogólnej. Tak więc, wśród pacjentów ze schyłkową PChN, to

niski poziom cholesterolu jest czynnikiem związanym ze złym rokowaniem, natomiast hipercholesterolemia wydaje się mieć korzystny wpływ na przeżycie. Istnieje wiele hipotez mających na celu wyjaśnienie tego „paradoksu czynników ryzyka” [4]. Najbardziej powszechna głosi, że związek niskiego stężenia cholesterolu ze śmiertelnością jest wynikiem wpływu niedożywienia i/lub przewlekłego procesu zapalnego. Powikłania te, charakterystyczne dla PChN, stanowią ewidentne czynniki ryzyka zgonu, a jednocześnie prowadzą do zmniejszenia stężenia cholesterolu osocza. Według innej hipotezy, nazwanej „różnicą czasową konkurujących czynników ryzyka” (*time discrepancy of competing risks*) hipercholesterolemia objawia swój niekorzystny wpływ na rozwój miażdżycy i na wystąpienie powikłań sercowo-naczyniowych na przestrzeni lat-dekad [24]. Jest więc długofalowym czynnikiem ryzyka. Hipocholesterolemia natomiast jest objawem niedożywienia i/lub przewlekłego procesu zapalnego, które prowadzą do zgonu w ciągu miesięcy i które w związku z tym nazwane zostały krótkofalowymi czynnikami ryzyka. Pacjenci z PChN charakteryzują się przewidywaną długością życia porównywalną z chorymi na raka okrężnicy, czy raka jajnika. Umierają, zanim hipercholesterolemia doprowadzi do powikłań związanych z procesem miażdżycowym. Można powiedzieć, że krótkofalowe czynniki ryzyka konkurują z długofalowymi i w PChN tę konkurencję wygrywiają.

Należy także wspomnieć o teoriach bezpośredniego (przyczynowo-skutkowego) wpływu podwyższonego poziomu lipidów na redukcję ryzyka zgonu [43]. Teorie te opierają się na doniesieniach o znaczeniu lipoprotein w wiązaniu endotoksyn bakteryjnych. Nazwane hipotezą „toksynowo-lipoproteinową” (*endotoxin-lipoprotein*), wydają się szczególnie prawdopodobne w przypadku pacjentów dializowanych, u których obok zaburzeń immunologicznych wynikających z mocznicy, ryzyko infekcji związane jest także z samą procedurą dializoterapii.

Ostatni cykl badań nad zaburzeniami lipidowymi w PChN miał na celu weryfikację hipotezy „różnicy czasowej konkurujących czynników ryzyka”. Podjęto również próbę rozstrzygnięcia, czy związek pomiędzy niskim poziomem cholesterolu a ryzykiem zgonu jest przyczynowo-skutkowy, czy też jest wynikiem wpływu niedożywienia i/lub przewlekłego procesu zapalnego, oddziałujących zarówno na poziom cholesterolu jak i na umieralność pacjentów [**praca 6, 7**].

Pierwsze z cyklu badań przeprowadzono na grupie 391 chorych rozpoczynających leczenie nerkozastępcze w Szwecji (grupa MIA) [**praca 6**]. Wśród licznych parametrów lipidowych, dla weryfikacji hipotezy „różnicy czasowej konkurujących czynników ryzyka” wybrano współczynnik apoB/apoA-I. Było to podyktowane faktem, że współczynnik ten jest

najsilniejszym „lipidowym” wykładnikiem ryzyka powikłań miażdżycowych i zgonu w populacji ogólnej, lepszym w tym względzie od poziomu całkowitego cholesterolu, cholesterolu LDL, czy współczynnika LDL/HDL [53]. Badaną hipotezę potwierdzono wykazując, że podwyższony współczynnik apoB/apoA-I w krótkim okresie obserwacji (jeden rok) związany był z lepszym przeżyciem (HR 0,35 [95% CI: 0,13-0,85]), jednak długofalowo (kolejne trzy lata dializoterapii) okazał się znamionym czynnikiem ryzyka zgonu (HR 1,72 [95% CI: 1,01-2,96]), tak jak w populacji ogólnej. Zjawisko to następnie potwierdzono w przypadku całkowitego cholesterolu w grupie 1191 pacjentów poddawanych dializoterapii (grupa NECOSAD) [praca 7]. W kohorcie tej podjęto się również rozstrzygnięcia drugiego z omawianych zagadnień, a mianowicie kwestii istnienia związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy niskim poziomem cholesterolu, a ryzykiem zgonu u pacjentów z PChN. Wykorzystano w tym celu epidemiologiczne narzędzie, zwane „randomizacją mendlowską” [55]. Opiera się ono na losowym rozdziale alleli w trakcie formowania gamet. W ten sposób rozdzielane losowo są polimorfizmy genetyczne, także te mające wpływ na poziom cholesterolu. Jednym z nich jest polimorfizm genu *apoE*. Gen ten występuje w trzech formach (allelach):  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$  [13]. Takie zróżnicowanie skutkuje powstaniem trzech izoform białka apolipoproteiny: E2, E3, E4. W licznych badaniach epidemiologicznych w populacji ogólnej stwierdzono znaczącą zależność pomiędzy poszczególnym polimorfizmem a stężeniem całkowitego cholesterolu i cholesterolu frakcji LDL. W ujęciu średnim, polimorfizm  $\epsilon 2$  wiąże się z obniżeniem stężenia całkowitego cholesterolu o 14 mg/dl, a polimorfizm  $\epsilon 4$  z podwyższeniem tego stężenia o 8 mg/dl, w porównaniu z najczęstszą formą  $\epsilon 3$ . Ma to również przełożenie na ryzyko rozwoju miażdżycy i powikłań sercowo-naczyniowych. Większość badań epidemiologicznych wykazała zwiększone ryzyko u osób z wariantem  $\epsilon 4$  genu [13]. Podobne zależności pomiędzy poszczególnymi allelami genu *apoE* a profilem lipidowym stwierdzono również wśród pacjentów z PChN [35].

Różnica w stężeniu cholesterolu jest w przypadku polimorfizmu *apoE* wrodzona, nie ma mowy o wpływie czynników zakłócających badaną zależność, jak niedożywienie czy stan zapalny. Posługując się metodą „randomizacji mendlowskiej”, jeśli niski poziom cholesterolu rzeczywiście jest przyczyną zwiększonej umieralności pacjentów z PChN, to podobny związek powinniśmy zaobserwować dla pacjentów z genetycznie uwarunkowanym niskim poziomem cholesterolu ( $\epsilon 2$ ) [4]. Badanie przeprowadzono na grupie 551 chorych dializowanych (NECOSAD). Wykazano spodziewaną znamioną zależność pomiędzy wariantem genetycznym a stężeniem cholesterolu osocza. W grupie z niższym stężeniem cholesterolu

(ε2) obserwowano nieznacznie mniejsze ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych i znacząco wyższe ryzyko zgonu z przyczyn innych niż sercowo-naczyniowe, w tym powikłań infekcyjnych. Pierwsza z obserwowanych zależności ma swoje wytłumaczenie w niższym ryzyku rozwoju miażdżycy wraz z jej powikłaniami w grupie pacjentów z niższym poziomem cholesterolu. Na uwagę zasługuje druga zależność, wskazująca na możliwość bezpośredniego wpływu niskiego stężenia cholesterolu na ryzyko zgonu, w zgodzie z przedstawioną powyżej teorią „toksynowo-lipoproteinową”.

## 5. Wnioski

Przeprowadzony cykl badań obejmował prace doświadczalne na zwierzęcych modelach PChN, badania *in vitro*, a także prace epidemiologiczne, także takie z wykorzystaniem badań genetycznych. To wieloaspektowe ujęcie zagadnienia z wykorzystaniem różnorodnych technik badawczych pozwoliło na przybliżenie skomplikowanego i wciąż słabo poznanego problemu, jakim są zaburzenia lipidowe w PChN.

Wyniki przedstawionych badań pozwoliły na postawienie następujących wniosków:

1. Czynnikiem odpowiedzialnym za wzrost syntezy cholesterolu i, w konsekwencji, hipercholesterolemię w doświadczalnej PChN jest zwiększenie ekspresji genetycznej jądrowego czynnika transkrypcyjnego SREBP-2. Pewne, choć najprawdopodobniej drugorzędne znaczenie ma upośledzony klirens cholesterolu.
2. Proces cholesterologenezy w doświadczalnej PChN może zostać wyhamowany podażą egzogenego cholesterolu, podlega zatem fizjologicznej regulacji w mechanizmie sprzężenia zwrotnego.
3. Ekspresja genetyczna i ilość receptora zmiatającego CD36 jest podwyższona na monocytach krwi pacjentów z PChN.
4. Ilość osoczowej formy CD36 (sCD36), oznaczona przy użyciu wypracowanego nowatorskiego immunoenzymatycznego testu podwójnego wiązania (ELISA), jest również podwyższona u pacjentów z PChN i jest związana z podwyższonym ryzykiem sercowo-naczyniowym.
5. Polimorfizmy genetyczne odpowiedzialne za profil lipidowy w populacji ogólnej występują z podobną częstością w grupie chorych z PChN. Ich wpływ na poziom lipidów, zaznaczony w stadium przeddializacyjnym, całkowicie zanika u pacjentów leczonych nerkozastępczo.
6. Obserwowana zależność pomiędzy niskim poziomem cholesterolu (lipidów) a zwiększoną śmiertelnością pacjentów dializowanych jest zależnością krótkoterminową, w zgodzie z hipotezą „różnicy czasowej konkurujących czynników ryzyka”. Jest ona w głównej mierze wynikiem wpływu niedożywienia i/lub przewlekłego procesu zapalnego wywieranego zarówno na poziom lipidów, jak i na umieralność dializowanych pacjentów.

## 6. Piśmiennictwo

1. Ando M., Gafvels M., Bergstrom J., Lindholm B., Lundkvist I.: Uremic serum enhances scavenger receptor expression and activity in the human monocytic cell line U937. *Kidney Int.* 1997, 51, 785-792.
2. Ando M., Lundkvist I., Bergstrom J., Lindholm B.: Enhanced scavenger receptor expression in monocyte-macrophages in dialysis patients. *Kidney Int.* 1996, 49, 773-780.
3. Bagdade J.D., Yee E., Wilson D.E., Shafir W.: Hyperlipidemia in renal failure: studies of plasma lipoproteins, hepatic triglyceride production, and tissue lipoprotein lipase in a chronically uremic rat model. *J. Lab. Clin. Med.* 1978, 91, 176-186.
4. Chmielewski M., Carrero J.J., Nordfors L., Lindholm B., Stenvinkel P.: Lipid disorders in chronic kidney disease: reverse epidemiology and therapeutic approach. *J. Nephrol.* 2008, 21, 635-644.
5. Chmielewski M., Carrero J.J., Stenvinkel P., Lindholm B.: Metabolic abnormalities in chronic kidney disease that contribute to cardiovascular disease, and nutritional initiatives that may diminish the risk. *Curr. Opin. Lipidol.* 2009, 20, 3-9.
6. Chmielewski M., Nieweglowski T., Swierczynski J., Rutkowski B., Boguslawski W.: Diurnal rhythm of cholesterol biosynthesis in experimental chronic renal failure. *Mol. Cell. Biochem.* 2001, 228, 33-37.
7. Chmielewski M., Sucajty E., Swierczynski J., Rutkowski B., Boguslawski W.: Contribution of increased HMG-CoA reductase gene expression to hypercholesterolemia in experimental chronic renal failure. *Mol. Cell. Biochem.* 2003, 246, 187-191.
8. Chmielewski M., Szolkiewicz M., Rutkowski B.: Lipid disorders in experimental chronic kidney disease: a role for SREBPs. *Kidney Int.* 2009, 75, 338.
9. Chmielewski M., Zdrojewski Z., Rutkowski B.: Benefits and menaces related to the use of statins in patients after renal transplantation. *Ann. Transplant.* 2002, 7, 6-10.
10. Dantoine T.F., Debord J., Charmes J.P., Merle L., Marquet P., Lachatre G., Leroux-Robert C.: Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1998, 9, 2082-2088.

11. Dautin G., Soltani Z., Ducloux D., Gautier T., Pais de Barros J.P., Gambert P., Lagrost L., Masson D.: Hemodialysis reduces plasma apolipoprotein C-I concentration making VLDL a better substrate for lipoprotein lipase. *Kidney Int.* 2007, 72, 871-878.
12. Dekker F.W., de Mutsert R., van Dijk P.C., Zoccali C., Jager K.J.: Survival analysis: time-dependent effects and time-varying risk factors. *Kidney Int.* 2008, 74, 994-997.
13. Eichner J.E., Dunn S.T., Perveen G., Thompson D.M., Stewart K.E., Stroehla B.C.: Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 2002, 155, 487-495.
14. Endemann G., Stanton L.W., Madden K.S., Bryant C.M., White R.T., Protter A.A.: CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 11811-11816.
15. Febbraio M., Podrez E.A., Smith J.D., Hajjar D.P., Hazen S.L., Hoff H.F., Sharma K., Silverstein R.L.: Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J. Clin. Invest.* 2000, 105, 1049-1056.
16. Fellstrom B.: Impact and management of hyperlipidemia posttransplantation. *Transplantation.* 2000, 70, S51-57.
17. Fellstrom B.C., Jardine A.G., Schmieder R.E., Holdaas H., Bannister K., Beutler J., Chae D.W., Chevaile A., Cobbe S.M., Gronhagen-Riska C., De Lima J.J., Lins R., Mayer G., McMahon A.W., Parving H.H., Remuzzi G., Samuelsson O., Sonkodi S., Sci D., Suleymanlar G., Tsakiris D., Tesar V., Todorov V., Wiecek A., Wuthrich R.P., Gottlow M., Johnsson E., Zannad F.: Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* 2009, 360, 1395-1407.
18. Guijarro C., Massy Z.A., Kasiske B.L.: Clinical correlation between renal allograft failure and hyperlipidemia. *Kidney Int. Suppl.* 1995, 52, S56-59.
19. Habib A.N., Baird B.C., Leypoldt J.K., Cheung A.K., Goldfarb-Rumyantzev A.S.: The association of lipid levels with mortality in patients on chronic peritoneal dialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, 21, 2881-2892.
20. Handberg A., Levin K., Hojlund K., Beck-Nielsen H.: Identification of the oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor CD36 in plasma: a novel marker of insulin resistance. *Circulation.* 2006, 114, 1169-1176.
21. Heimbürger O., Stenvinkel P., Berglund L., Tranoeus A., Lindholm B.: Increased plasma lipoprotein(a) in continuous ambulatory peritoneal dialysis is related to peritoneal transport of proteins and glucose. *Nephron.* 1996, 72, 135-144.

22. Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S.: SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 2002, 109, 1125-1131.
23. Iseki K., Yamazato M., Tozawa M., Takishita S.: Hypocholesterolemia is a significant predictor of death in a cohort of chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2002, 61, 1887-1893.
24. Kalantar-Zadeh K., Horwich T.B., Oreopoulos A., Kovesdy C.P., Younessi H., Anker S.D., Morley J.E.: Risk factor paradox in wasting diseases. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2007, 10, 433-442.
25. Kilpatrick R.D., McAllister C.J., Kovesdy C.P., Derose S.F., Kopple J.D., Kalantar-Zadeh K.: Association between serum lipids and survival in hemodialysis patients and impact of race. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007, 18, 293-303.
26. Kim C., Vaziri N.D.: Down-regulation of hepatic LDL receptor-related protein (LRP) in chronic renal failure. *Kidney Int.* 2005, 67, 1028-1032.
27. Kimura H., Miyazaki R., Imura T., Masunaga S., Suzuki S., Gejyo F., Yoshida H.: Hepatic lipase mutation may reduce vascular disease prevalence in hemodialysis patients with high CETP levels. *Kidney Int.* 2003, 64, 1829-1837.
28. Kisielnicka E., Zdrojewski Z., Wroblewska M., Kortas B., Rutkowski B.: Lipid disturbances in a two-year follow-up after successful kidney transplantation. *Transplant. Proc.* 2000, 32, 1358-1362.
29. Konishi Y., Okamura M., Konishi M., Negoro N., Yoshida T., Inoue T., Kanayama Y., Yoshikawa J.: Enhanced gene expression of scavenger receptor in peripheral blood monocytes from patients on cuprophane haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997, 12, 1167-1172.
30. Kovesdy C.P., Anderson J.E., Kalantar-Zadeh K.: Inverse association between lipid levels and mortality in men with chronic kidney disease who are not yet on dialysis: effects of case mix and the malnutrition-inflammation-cachexia syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007, 18, 304-311.
31. Krol E., Rutkowski B., Czarniak P., Kraszewska E., Lizakowski S., Szubert R., Czekalski S., Sulowicz W., Wiecek A.: Early detection of chronic kidney disease: results of the PolNef study. *Am. J. Nephrol.* 2009, 29, 264-273.
32. Kronenberg F., Konig P., Neyer U., Auinger M., Pribasnig A., Lang U., Reitingner J., Pinter G., Utermann G., Dieplinger H.: Multicenter study of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotypes in patients with end-stage renal disease treated by

- hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1995, 6, 110-120.
33. Levey A.S., Eckardt K.U., Tsukamoto Y., Levin A., Coresh J., Rossert J., De Zeeuw D., Hostetter T.H., Lameire N., Eknoyan G.: Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2005, 67, 2089-2100.
  34. Liang K., Vaziri N.D.: Upregulation of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in chronic renal failure. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002, 283, E676-681.
  35. Liberopoulos E., Siamopoulos K., Elisaf M.: Apolipoprotein E and renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 2004, 43, 223-233.
  36. Liu Y., Coresh J., Eustace J.A., Longenecker J.C., Jaar B., Fink N.E., Tracy R.P., Powe N.R., Klag M.J.: Association between cholesterol level and mortality in dialysis patients: role of inflammation and malnutrition. *JAMA.* 2004, 291, 451-459.
  37. Lowrie E.G., Lew N.L.: Death risk in hemodialysis patients: the predictive value of commonly measured variables and an evaluation of death rate differences between facilities. *Am. J. Kidney Dis.* 1990, 15, 458-482.
  38. Moradi H., Yuan J., Ni Z., Norris K., Vaziri N.D.: Reverse cholesterol transport pathway in experimental chronic renal failure. *Am. J. Nephrol.* 2009, 30, 147-154.
  39. Nozaki S., Kashiwagi H., Yamashita S., Nakagawa T., Kostner B., Tomiyama Y., Nakata A., Ishigami M., Miyagawa J., Kameda-Takemura K., et al.: Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J. Clin. Invest.* 1995, 96, 1859-1865.
  40. O'Neal D., Lee P., Murphy B., Best J.: Low-density lipoprotein particle size distribution in end-stage renal disease treated with hemodialysis or peritoneal dialysis. *Am. J. Kidney Dis.* 1996, 27, 84-91.
  41. Podrez E.A., Febbraio M., Sheibani N., Schmitt D., Silverstein R.L., Hajjar D.P., Cohen P.A., Frazier W.A., Hoff H.F., Hazen S.L.: Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J. Clin. Invest.* 2000, 105, 1095-1108.
  42. Prichard S.S.: Management of hyperlipidemia in patients on peritoneal dialysis: current approaches. *Kidney Int. Suppl.* 2006, S115-117.
  43. Rauchhaus M., Coats A.J., Anker S.D.: The endotoxin-lipoprotein hypothesis. *Lancet.* 2000, 356, 930-933.

44. Rutkowski B.: Epidemiologia chorób nerek. W: Myśliwiec M. (red.): Choroby nerek. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2009, 69-77.
45. Rutkowski B., Chmielewski M.: Mechanisms of lipid disturbances in chronic renal failure. W: Andreoli T.E., Ritz E., Rosivall L. (red.): Nephrology, Hypertension, Dialysis, Transplantation. Hungarian Kidney Foundation, Budapest, 2005, 467-476.
46. Rutkowski B., Lichodziejewska-Niemierko M., Grenda R., Czekalski S., Durlik M., Bautembach S.: Raport o stanie leczenia nerkozastępczego w Polsce - 2008. Gdańsk: Drukonsul, 2010.
47. Rutkowski B., Szolkiewicz M., Korczynska J., Sucajtyś E., Stelmanska E., Niewegłowski T., Swierczyński J.: The role of lipogenesis in the development of uremic hyperlipidemia. *Am. J. Kidney Dis.* 2003, 41, S84-88.
48. Sampson M.J., Davies I.R., Braschi S., Ivory K., Hughes D.A.: Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 2003, 167, 129-134.
49. Silverstein R.L., Febbraio M.: CD36 and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 2000, 11, 483-491.
50. Stenvinkel P., Berglund L., Heimbürger O., Pettersson E., Alvestrand A.: Lipoprotein(a) in nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 1993, 44, 1116-1123.
51. Szolkiewicz M., Niewegłowski T., Korczynska J., Sucajtyś E., Stelmanska E., Goyke E., Swierczyński J., Rutkowski B.: Upregulation of fatty acid synthase gene expression in experimental chronic renal failure. *Metabolism.* 2002, 51, 1605-1610.
52. Vaziri N.D., Liang K.: Down-regulation of VLDL receptor expression in chronic experimental renal failure. *Kidney Int.* 1997, 51, 913-919.
53. Walldius G., Jungner I.: The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy--a review of the evidence. *J. Intern. Med.* 2006, 259, 493-519.
54. Wanner C., Krane V., Marz W., Olschewski M., Mann J.F., Ruf G., Ritz E.: Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* 2005, 353, 238-248.
55. Zoccali C., Testa A., Spoto B., Tripepi G., Mallamaci F.: Mendelian randomization: a new approach to studying epidemiology in ESRD. *Am. J. Kidney Dis.* 2006, 47, 332-341.