

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL  
Infotehnoloogia teaduskond

Joosep Paats 183013YADM

**TRÜPTOFAANI JA TRÜPTOFAANI  
METABOLIITIDE TASEMED JA  
EEMALDAMINE KROONILISE  
NEERUPUUDULIKKUSEGA  
PATSIENTIDEL HEMODIALÜÜSRAVI  
KÄIGUS**

Magistritöö

Juhendajad: Jürgen Arund  
vanemteadur, PhD  
Ivo Fridolin  
professor, PhD

Tallinn 2020

## **Autorideklaratsioon**

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Joosep Paats

18.05.2020

## Annotatsioon

Hemodialüüsravi raviseadistuste ja modaliteetide mõju trüptofaani (Trp) ja Trp metaboliitide eemaldamisele pole terviklikult uuritud. Käesoleva töö eesmärk oli hinnata dialüüsravi mõju Trp ja Trp metaboliitide indoksüül-3-sulfaat (IS) ning indool-3-äädikhape (IAA) eemaldamisele modaliteedi ja dialüüsravi seadistuste põhised. Dialüüsiseansi ajal vähenesid 78 patsiendi keskmised urea, IS-i ja IAA koguhulga kontsentratsioonid veres (vastavalt -72%, -39%, -43%), kuid Trp kontsentratsioon suurenes (8%), ( $p < 0,001$ ). Trp kontsentratsioonide järgi vereproovides ei saa seetõttu dialüüsil eemaldatud Trp hulka hinnata. Kõrgefektiivne hemodiafiltratsioon eemaldas verest 80% enam Trp kui minimaalsete seadistusega tavaline hemodialüüs ( $p < 0,001$ ). Dialüüsiseansi alguses vähenes valkudega seonduvate ureemiliste toksiinide valkudega seondumise määr, kuid suurenes dialüüsiseansi lõpuks.

Lõputöö on kirjutatud eesti keeles ning sisaldab teksti 44 leheküljel, 7 peatükki, 7 joonist, 4 tabelit.

Märksõnad: ureemilised toksiinid, valkudega seonduvad ühendid, trüptofaan, indoksüül-3-sulfaat, indool-3-äädikhape, krooniline neerupuudulikkus, hemodialüüs, hemodiafiltratsioon.

CERCS koodid: B560 uroloogia, nefroloogia; T115 Meditsiinitehnika.

## **Abstract**

### **Levels and removal of tryptophan and tryptophan derivatives in chronic kidney failure patients, effect of dialysis machine settings.**

Tryptophan (Trp) is an essential amino acid that is a precursor for uremic toxins indoxyl-3-sulphate (IS) and indole-3-acetic acid (IAA). The aim of this thesis was to assess the levels of Trp, IS and IAA in chronic kidney failure patients and removal efficiency of Trp, IS and IAA during different dialysis modalities like haemodialysis and haemodiafiltration, and dialysis treatment settings. Some results of this work have been recently published in the International Journal of Molecular Sciences in the article “Serum Levels and Removal by Haemodialysis and Haemodiafiltration of Tryptophan-Derived Uremic Toxins in ESKD Patients”, 2020, (doi: 10.3390/ijms21041522).

Dialysis sessions of 78 chronic kidney failure patients were studied. Patients were enrolled from 4 different European dialysis centres from Estonia, Sweden, Belgium and Spain. Blood and spent dialysate samples obtained during the dialysis sessions were analysed with high-performance liquid chromatography to assess the free and total levels of Trp, IS, IAA. Reduction ratios (RR), percentage protein binding (PB) and total removed solute (TRS) were calculated.

Mean pre-dialysis levels of free and total Trp, IS in serum had a rather non-systematic difference between different dialysis centres, whereas levels of total and free IAA were comparable. A negative correlation was found between the concentration of total Trp and free IS ( $r = -0,48$ ;  $p < 0,001$ ) and IAA ( $r = -0,21$ ;  $p < 0,001$ ). This may represent enhanced Trp degradation due to inflammation or higher free Trp concentration for patients with higher levels of IS and IAA.

While mean serum levels of urea, IS and IAA decreased during the dialysis session (-72%, -39%, -43%), serum levels of Trp increased (8%) towards the end of dialysis ( $p < 0,001$ ) despite notable Trp losses into the spent dialysate. This is in accordance with previous smaller-scale studies.

The levels of Trp in spent dialysate were quite stable through the dialysis, while the levels of other uremic solutes decreased. Serum and dialysate Trp concentrations and RR behaved differently from uremic solutes IS, IAA and urea, thus RR of Trp did not reflect Trp dialysis losses.

Comparison of solutes removal by modality and dialysis treatment settings showed significant differences between modalities with the highest differences for Trp removal. Although RR and TRS trends were similar for different modalities and dialysis treatment settings, high-efficiency haemodiafiltration resulted in 80% higher Trp losses than conventional low-flux dialysis ( $p < 0,001$ ). That was also accompanied by lower removal of uremic toxins by low-flux conventional dialysis.

Pre-dialysis mean percentage protein binding (PB) was as follows: Trp  $77 \pm 8\%$ , IS  $87 \pm 5\%$ , IAA  $75 \pm 6\%$ . Surprisingly, 60 minutes after the start of dialysis, PB had decreased for Trp, IS and IAA ( $p < 0,001$ ). That resulted in the rise of free Trp and IS concentration ( $p < 0,001$ ). At the end of the dialysis session PB was increased for Trp, IS and IAA in comparison to the pre-dialysis PB ( $p < 0,001$ ). The effect may be related to the release of lipolytic enzymes by heparin injection at the beginning of dialysis session which results in the rise of free fatty acids, leading to the competitive binding with albumin and enhanced free toxin concentration. As protein binding is influenced by a multitude of factors, further studies are required to confirm heparin is the cause of this phenomenon.

The thesis is in Estonian and contains 44 pages of text, 7 chapters, 7 figures, 4 tables.

Keywords: uremic toxins, protein-bound solutes, tryptophan, indoxyl-3-sulfate, indole-3-acetic acid, chronic kidney failure, haemodialysis, haemodiafiltration.

CERCS code: B560 Urology, nephrology; T115 Medical technology.

## Lühendite ja mõistete sõnastik

Arteriaalne vereliin	<i>Arterial bloodline</i>
D	Heitdialüsaadis
Dialüüsitee	<i>Arteriovenous fistula</i>
GFR	Glomerulaarne filtratsioonikiirus ( <i>glomerular filtration rate</i> )
HD	Hemodialüüs
HDF	Hemodiafiltratsioon
HF	Hemofiltratsioon
HPLC	Kõrgsurvevedelikromatograafia ( <i>high-performance liquid chromatography</i> )
IAA	Indool-3-äädikhape ( <i>indole-3-acetic-acid</i> )
IS	Indoksüül-3-sulfaat ( <i>Indoxyl-3-sulfate</i> )
KNH	Krooniline neeruhaigus ( <i>chronic kidney disease</i> )
KNP	Krooniline neerupuudulikkus ( <i>chronic kidney failure</i> )
PB	Valkudega seondunud aine määr protsentides ( <i>protein bound percentage</i> )
RR	Ainete eemaldamise määr algkontsentratsiooni suhtes protsentides ( <i>removal rate</i> )
S	Vereseerumis
Trp	Trüptofaan
TRS	Eemaldatud aine koguhulk ( <i>total removed solute</i> )
UV	Ultravioletne kiirgus
UV-VIS	Ultravioletne ja nähtav valgus

## Sisukord

1 Sissejuhatus .....	11
2 Kirjanduse ülevaade .....	13
2.1 Krooniline neerupuudulikkus .....	13
2.2 Hemodialüüsravi.....	14
2.3 Ureemilised ühendid.....	16
2.4 Aminohapped ja nende eemaldamine dialüüsiga .....	18
2.5 Trüptofaan ja trüptofaani metaboliidid.....	20
2.6 Hemodialüüsravi kvaliteedi hindamine .....	22
2.7 Ureemiliste toksiinide analüüsimeetodid.....	24
2.8 Kõrgsurvevedelikkromatograafia .....	25
3 Töö eesmärk .....	28
4 Metoodika.....	29
4.1 Patsientide valim ja dialüüsravi seadistused.....	29
4.2 Analüüsitavad proovid.....	31
4.3 Vereseerumi- ja heitdialüsaadi proovide ettevalmistus .....	32
4.4 Kasutatud lahused.....	32
4.5 Ureemiliste toksiinide analüüs HPLC-ga .....	33
5 Tulemused .....	36
5.1 Trüptofaani ja trüptofaani metaboliitide dialüüsieelsed tasemed ja omavahelised seosed.....	36
5.2 Trüptofaani ja trüptofaani metaboliitide tasemete ja valkudega seondumise muutused dialüüsiseansi käigus.....	38
5.3 Dialüüsravi seadistuste ja modaliteedi mõju trüptofaani ja ureemiliste toksiinide eemaldamisele .....	42
6 Arutelu.....	45
7 Kokkuvõte .....	52
Kasutatud kirjandus .....	55
Lisa 1 – HPLC-ga analüüsitud hetidialüsaadi proovi kromatogramm, millel on määratud Trp-i, IS-i ja IAA piigid.....	69

Lisa 2 – Trp-i, IS-i, IAA kogu ainehulga ja urea keskmised kontsentratsioonid vereseerumis normaliseerituna dialüüsieelsete kontsentratsioonide suhtes kõikide patsientide üleselt (n = 310) .....	70
Lisa 3 – Trp-i, IS-i, IAA vaba ainehulga ja urea keskmised kontsentratsioonid vereseerumis normaliseerituna dialüüsieelsete kontsentratsioonide suhtes kõikide patsientide üleselt (n = 310) .....	71
Lisa 4 – Trp-i, IS-i, IAA ja urea keskmised kontsentratsioonid heitdialüsaadis normaliseerituna dialüüsieelsete kontsentratsioonide suhtes kõikide patsientide üleselt (n = 257) .....	72



## Jooniste loetelu

Joonis 1. Lihtsustatud skeem ureemiliste ühendite eemaldamisest dialüsaatoriga .. .....	15
Joonis 2. Kõrgsurve vedelikkromatograafia süsteemi moodulid ja põhikomponendid ..	26
Joonis 3. Indoksüül-3-sulfaadi standardlahuste analüüsimisel saadud kalibreerimisgraafik .....	34
Joonis 4. Keskmise Trp-i, IS-i, IAA ( $\mu\text{mol/L}$ ), urea ( $\text{mmol/L}$ ) kontsentratsioon ja standardhälve dialüüsiseansi erinevatel ajapunktidel kõikide patsientide üleselt .....	39
Joonis 5. IS-i, Trp-i ja IAA keskmine valkudega seondumise osakaal dialüüsiseansi käigus kõikide patsientide üleselt .....	40
Joonis 6. Keskmise Trp-i, IS-i, IAA ja urea kontsentratsiooni vähenemise määr dialüüsieelse kontsentratsiooni suhtes (RR) ja standardhälve dialüüsiseansi erinevatel ajapunktidel kõikide patsientide üleselt.....	41
Joonis 7. Keskmised RR väärtused dialüüsiseansi lõpus ning keskmine eemaldatud Trp-i, IS-i, IAA ( $\mu\text{mol}$ ) ja urea koguhulk ( $\text{mmol}$ ) raviseadistuse ja modaliteedi põhiselt standardhälvetega .....	44

## **Tabelite loetelu**

Tabel 1. Uuringus osalenud patsientide valimi kliinilised andmed .....	29
Tabel 2. Ureemiliste toksiinide eemaldamise efektiivsuse analüüsimiseks kasutatud raviseadistused ja modaliteedid .....	30
Tabel 3. Patsientide dialüüsieelsed ureemiliste toksiinide ja Trp-i kontsentratsioonid veres .....	36
Tabel 4. Patsientide dialüüsieelsete ureemiliste toksiinide ja Trp-i kontsentratsioonide omavahelised statistilised seosed ..	37

## 1 Sissejuhatus

Krooniline neeruhaigus on maailma tervishoiusüsteemi üks enam koormavatest haigustest, mille süvenemisel võib patsientidel kujuneda krooniline neerupuudulikkus, mille peamine ravimeetod on hemodialüüsravi. 2016. aastal oli maailmas 2,7 miljonit hemodialüüsravi saavat patsienti [1] ning prognooside kohaselt suureneb dialüüsravi vajavate patsientide arv 2030 aastaks 5,4 miljonini [2].

Hemodialüüsravi käigus eemaldatakse dialüüsimasinaga patsientide verest kroonilise neeruhaiguse tõttu kehasse kogunenud ureemilised toksiinid ning kõrvalmõjuna patsiendile vajalikke toitaineid ja molekule, nende hulgas trüptofaani [3]. Dialüüsravi kvaliteeti hinnatakse praktikas enim markermolekul urea eemaldamise järgi korra kuus dialüüsiseansi eelselt ja järgselt võetavate vereproovide alusel [4]. Urea eemaldamine aga ei iseloomusta valkudega seonduvate ja keskmise suurusega ureemiliste ühendite eemaldamist ning seega dialüüsravi kogukvaliteeti [5][6][7].

Hemodialüüsi kvaliteedi efektiivsemaks hindamiseks arendatakse seetõttu optilisi meetodeid, mis põhinevad dialüüsiseansi käigus tekkiva heitdialüsaadi UV-neelduvuse ja fluorestsentsi mõõtmisel ja võimaldavad jälgida reaalaajas erinevate ureemiliste toksiinide eemaldamist dialüüsiseansi käigus [8][9]. Seejuures on heitdialüsaati eemaldatud valkudega seonduvate molekulide põhjustatud fluorestsents ergastuslainepikkusel  $\lambda = 280$  nm ja emissioon lainepikkusel  $\lambda = 350$  nm peamiselt seotud trüptofaani ja trüptofaani metaboliitidega, mistõttu on heitdialüsaadi fluorestsentsi mõõtmine mainitud lainepikkustel suure potentsiaaliga valkudega seonduvate ureemiliste toksiinide eemaldamise koguse hindamiseks dialüüsiseansi käigus [10].

Dialüüsiseansi käigus muutuva heitdialüsaadi fluorestsentsisignaali intensiivsuse interpreteerimiseks mainitud lainepikkustel on seetõttu oluline mõista trüptofaani ja trüptofaani metaboliitide verest heitdialüsaati eemaldamist ning dialüüsravi seadistustest ja modaliteedist tulenevat mõju.

Hetkel ei ole samaaegselt trüptofaani ja trüptofaani metaboliitide eemaldamist dialüüsiseansi käigus põhjalikult uuritud ega võetud arvesse dialüüsravi seadistustest ja modaliteetidest tulenevalt mõju.

Käesoleva töö eesmärk oli hinnata dialüüsravi mõju trüptofaani ja toksiliste trüptofaani metaboliitide eemaldamisele kroonilise neerupuudulikkusega patsientide ravil modaliteedi ja dialüüsravi seadistuste põhisel.

Käesolev töö on valminud projekti „On-line Dialysis Sensor Phase 2“ (OLDIAS2), (1.08.2017–31.07.2019) raames, mille eesmärk oli valideerida kliinilistes tingimustes optilise sensori töökindlust, mis võimaldab reaalajas heitdialüsaadi UV-neelduvuse ja fluorestsentsi põhjal hinnata erinevatesse ureemiliste ühendite klassidesse kuuluvate ühendite eemaldamist dialüüsi käigus [11]. Töö tulemusena loodud andmebaasi on kasutatud Optofluid Technologies OÜ poolt arendatava multikomponentse sensoriga mõõdetud heitdialüsaadi fluorestsentsisignaali interpreteerimiseks ja optilise sensori töökindluse valideerimiseks kliinilistes tingimustes. Ühtlasi aitavad töö tulemused nefroloogidel paremini hinnata rakendatava hemodialüüsravi raviseadistuste ja modaliteetide mõju trüptofaani ja toksiliste trüptofaani metaboliitide eemaldamisele ja parendada seeläbi kroonilise neerupuudulikkusega patsientidele rakendatavat ravi.

Magistritöö ettevalmistamise käigus tehtud katsete tulemused ja nende analüüsil saadud andmed on osaliselt avaldatud publikatsioonis „Serum Levels and Removal by Haemodialysis and Haemodiafiltration of Tryptophan-Derived Uremic Toxins in ESKD Patients“ ajakirjas *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, (doi: 10.3390/ijms21041522) [12].

## 2 Kirjanduse ülevaade

### 2.1 Krooniline neerupuudulikkus

Neerud on kuseloomeelundid, mis moodustavad kusesüsteemi funktsionaalse osa ning osalevad organismi homöostaasi tagamisel. Neerud reguleerivad vere elektrolüütide- ja happe-alus tasakaalu, osmooset rõhku, veresuhkru taset, vereplasma ruumala ning vererõhku, eemaldavad verest metabolismi lõpp-produkte ning jääkaineid. Samuti tegelevad neerud hormoonide metabolismi ja sekretsiooniga, reguleerides sealhulgas erütrotsüütide produktsiooni [13].

Neerude funktsionaalsust ja tervislikku seisundit hinnatakse praktikas enim glomerulaarse filtratsioonikiiruse järgi (GFR), mis iseloomustab neerude poolt filtreeritava vereplasma ruumala minuti kohta [14]. Samuti hinnatakse kroonilise neeruhaiguse raskusastet uriini valgusisalduse ehk proteiinuuria järgi [15]. GFR on neeruhaiguseta noortel täiskasvanutel vahemikus 100 – 130 ml/min 1,73 m<sup>2</sup> kehapindala kohta, vanuse suurenedes GFR ajapikku väheneb [15]. Krooniline neeruhaigus on defineeritud kui vähemalt kolme kuu pikkune neerude funktsionaalsuse vähenemine, millal GFR < 60 ml/min 1,73 m<sup>2</sup> kehapindala kohta [16]. Krooniline neeruhaigus (KNH) on pöördumatu ja progresseeruva iseloomuga [14].

Peamised haigusseisundid, mis KNH-st põhjustavad on diabeet, kõrgvererõhutõbi, glomerulonefriit, südame- ja veresoonkonnahaigused, uroloogilised- ja tsüstilised haigused [17]. Mitmed KNH-st põhjustavad haigused võivad olla kaasasündinud või päriliku eelsoodumusega [17].

KNH mõjutab kõiki organismi elundkondi [14]. Neerude funktsionaalsuse vähenemise tõttu kogunevad kehasse jääkained ning üleliigne vedelik, tekivad metabolismi-, hormonaalsed- ja kognitiivsed häired. Kroonilise neeruhaigusega kaasneb aneemia, kõrgvererõhutõbi ja suureneb kardiovaskulaarsetesse haigustesse haigestumise risk [14] [18][19].

Kroonilise neeruhaiguse ägenemisel ja neerufunktsioonide vähenemisel võib KNH-ga patsiendil kujuneda krooniline neerupuudulikkus (KNP). Kroonilise neerupuudulikkuse korral on GFR väärtus  $< 15 \text{ ml/min } 1,73 \text{ m}^2$  kehapindala kohta [16]. Vähenenud neerufunktsioonide tõttu vajavad kroonilise neerupuudulikkusega patsiendid elus püsimiseks pidevat neeruasendusravi või doonorneeru siirdamist.

Kõige efektiivsem ravimeetod on doonorneeru siirdamine, kuid neerudoonorite vähesuse, patsientide kliinilise seisundi ja immunoloogilise sobimatuse tõttu saab seda võimaldada suhteliselt väikesele osale patsientidest [20]. Ameerika Ühendriikides oli 2014. aastal neerusiirdamine esmaseks ravimeetodiks 17% neerupuudulikkusega patsientidel [21]. Seetõttu on enamusele patsientidele esmalt määratavaks ravimeetodiks dialüüsravi, mida on kahte tüüpi: peritoneaaldialüüs ja hemodialüüs.

Peritoneaaldialüüsi puhul kasutatakse dialüüsi läbiviimiseks patsiendi kõhuõõnt, kuhu infuseeritakse kateetri kaudu dialüsaat. Peritoneaaldialüüsi puhul toimib kõhukelme poolläbilaskva membraanina läbi mille jääkained kõhuõõnes olevasse dialüsaati difundeeruvad. Seejärel eemaldatakse dialüüsimasinaga kõhuõõnest heitdialüsaat ning protsessi korratakse [22].

## **2.2 Hemodialüüsravi**

Käesolev magistritöö keskendub hemodialüüsravile.

Hemodialüüsi korral suunatakse patsiendi veri kehavälise vereringe kaudu dialüüsimasinasse, mis eemaldab patsiendi verest metabolismi lõpp-produktid, jääkained ning korrigeerib elektrolüütide ja vedeliku taset kehas [22].

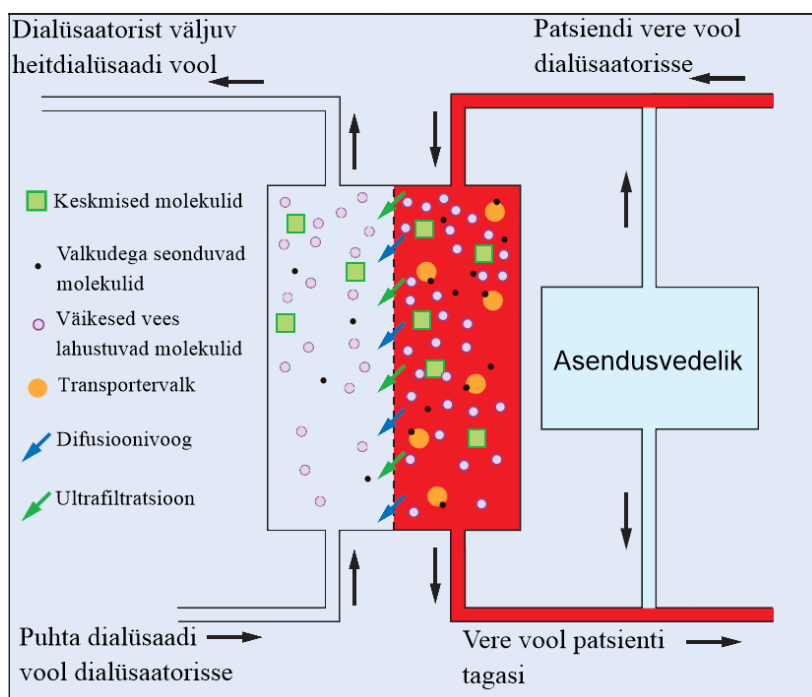
2016. aastal oli maailmas 2,7 miljonit hemodialüüsravi saavat patsienti ning 0,7 miljonile patsiendile oli siirdatud doonorneer [1]. Prognooside kohaselt suureneb vananeva rahvastiku, diabeedi ja kõrgvererõhu diagnoosiga patsientide arvu suurenemise tõttu dialüüsravi vajavate patsientide arv 2030 aastaks 5,4 miljonini [2].

Hemodialüüsravi teostamiseks KNP-ga patsientidele on vaja ligipääsu patsiendi veresoontele ehk dialüüsited, mille kaudu on võimalik patsiendi veri dialüüsimasinasse juhtida.

Pikaajaline dialüüsisee rajatakse kirurgilise operatsiooniga, millega luuakse arterio-venoosne fistul ehk arteri ja veeni vaheline ühendus või paigaldatakse veeni pikaajaline kateeter [23].

Dialüüsistest suunatakse patsiendi arteriaalne veri vooliku (arteriaalse vereliini) kaudu dialüüsimasinasse ning pärast vere puhastamist vooliku (venoosse vereliini) kaudu tagasi dialüüsisee veeni [24]. Ummistuste ja trombide tekke vältimiseks infuseeritakse tavaliselt dialüüsi arteriaalsesse vereliini hepariini või fraktsioneeritud hepariini lahust, mis takistab vere hüübimist [25].

Hemodialüüsimasina funktsionaalne osa on dialüsaator (vt Joonis 1), mis koosneb poolläbilaskva membraaniga õõnesfiiberitest, mida veri läbib. Poorseid õõnesfiibreid ümbritsevat suletud ruumiosa läbib vastassuunas elektrolüüte ja glükoosi sisaldav puhastusvedelik ehk dialüsaat. Dialüsaator koosneb seega kahest eraldiseisvast ruumist, mis on eraldatud poolläbilaskva membraaniga, mida dialüüsi käigus veres ja dialüsaadis lahustunud ained valikuliselt läbivad. Dialüsaatori ainete eemaldamise efektiivsus ja selektiivsus sõltub dialüsaatori kogupindalast, dialüsaatori membraani läbimõõdust ning materjalist, poride suurusest ja hulgast [22].



Joonis 1. Lihtsustatud skeem ureemiliste ühendite eemaldamisest dialüsaatoriga. Joonisel on kujutatud hemodiafiltratsiooni modaalsusega dialüsaatorit. Hemodiafiltratsioonil eemaldatakse ureemilised ühendid difusiooni ja ultrafiltratsiooni koosmõjul. Valkude seonduvatest molekulidest eemaldatakse ainult vaba osa, keskmiste molekulide eemaldamine sõltub membraani pindalast ja porisuurusest ([26] järgi).

Dialüüsi käigus ainete eemaldamist verest heitdialüsaati mõjutavad järgmised füüsikalised protsessid: difusioon, ultrafiltratsioon ja adsorptsioon. Domineerivate füüsikaliste protsesside järgi ainete eemaldamisel eristatakse järgnevaid hemodialüüsi modaliteete [22]:

- 1) tavapärase hemodialüüsi (HD) – difusioon.
- 2) hemofiltratsioon (HF) – ultrafiltratsioon.
- 3) hemodiafiltratsioon (HDF) – difusiooni ja ultrafiltratsioon kombineeritult.

Modaliteetide kirjeldamisel kasutatakse samuti dialüüsi efektiivsust mõjutavaid vere- ja dialüsaadi voolu kiiruseid ning vooge. HF ja HDF puhul infuseeritakse patsiendi verre ultrafiltratsiooni käigus eemaldatud vedeliku kaotuse kompenseerimiseks asendusvedelikuna vereplasma koostisega sarnanevat dialüsaati. HF ja HDF modaliteete kirjeldatakse sellest tulenevalt ka asendatud vereplasma ruumala ning asendusvedeliku infuseerimise asukoha järgi dialüsaatori suhtes [22].

Üksikute ainete eemaldamine sõltub kokkuvõtlikult modaliteedist, kontsentratsiooni- ja rõhugradiendist, dialüsaatorist, ning konkreetse aine massist, lahustuvusest ja valkude seotusest [22]. Seejuures eemaldatakse hemodialüüsi käigus lisaks jääkainetele ka vajalikke molekule ja toitaineid, nt aminohappeid, vitamiine ja väiksemaid valke [3][27]. Neeruasendusraviks teostatakse kroonilise neerupuudulikkusega patsientidele nädalas tavaliselt kolm dialüüsiseansi kestusega 3,5 – 4 h [4].

### **2.3 Ureemilised ühendid**

KNH-ga patsientide kehasse akumuleerub palju erinevate füüsikaliste ja keemiliste omadustega aineid ehk ureemilisi ühendeid, mis tervetel inimestel eemaldatakse kehast uriiniga [18]. Erinevaid ureemilisi ühendeid on tuvastatud üle 270 [28], mille hulka kuuluvad ka toksilised biokeemilise aktiivsusega ained – ureemilised toksiinid [18] [29].



Euroopa ureemiliste toksiinide töögrupi soovitusel (EUTox) jaotatakse ureemilised ühendid suuruse ja valkudega seondumise järgi kolme rühma [30]:

- 1) väikesed vees lahustuvad molekulid,  $M_r < 500$  Da, markermolekul uurea [29];
- 2) keskmise suurusega molekulid,  $M_r > 500$  Da – 60 kDa, peamiselt kuuluvad siia gruppi peptiidid, markermolekul  $\beta$ 2-mikroglobuliin [29];
- 3) valkudega seonduvad molekulid, enamasti  $< 500$  Da, markermolekul indoksüül-3-sulfaat (IS) [29].

Kõikidest ureemilistest ühenditest ligi poole moodustavad väikesed vees lahustuvad molekulid ning keskmise suurusega ja valkudega seonduvad molekulid kumbki veerandi koguhulgast [31]. Kõikides ureemiliste ühendite rühmades leidub ureemilisi toksine, mille suurenenud kontsentratsioon tekitab kardiovaskulaarseid haiguseid, põletikulisi reaktsioone, fibroosi ja teisi komplikatsioone, põhjustades seeläbi kõrgemat patsientide suremust võrreldes muu elanikkonnaga [29]. Seetõttu on dialüüsi käigus oluline samaaegselt eemaldada erinevatesse ureemiliste ühendite rühmadesse kuuluvaid aineid. Kõige efektiivsemalt eemaldatakse dialüüsravi käigus väikeseid vees lahustuvaid molekule ning kõige väheefektiivsemalt valkudega seonduvaid molekule [5][6][32].

Keskmise suurusega ja valkudega seonduvate molekulide eemaldamiseks on kõige efektiivsem ultrafiltratsioonil põhinev dialüüsravi ning difusioonil põhinev dialüüsravi sobib paremini väikeste vees lahustunud ainete eemaldamiseks [5][32]. Kõige efektiivsem hemodialüüsi modaliteet erinevate ainete samaaegseks eemaldamiseks on difusiooni ja ultrafiltratsiooni koosmõju tõttu HDF [5][6][32].

Valkudega seonduvate ureemiliste toksiinide eemaldamise efektiivsus sõltub valkudega mitte seotud ureemiliste toksiinide vabast osast vereseerumis, mis on võimeline läbi membraani difundeeruma. Seetõttu on sellesse rühma kuuluvate ureemiliste toksiinide eemaldamine kõige keerukam [33]. Valkudega seonduvate ureemiliste toksiinide eemaldamise efektiivsuse suurendamiseks dialüüsil on viimastel aastatel hakatud uurima ureemiliste toksiinidega valkudega seondumisel konkureerivaid ühendeid, mida patsientidele dialüüsravi käigus manustada [33][34][35].

## 2.4 Aminohapped ja nende eemaldamine dialüüsiga

Aminohapped on inimesele rasvade ja süsivesikute kõrval tähtsaimad toitained. Aminohappeid kasutatakse substraadina peptiidide, valkude ning elutähtsate biomolekulide sünteesimiseks või energia saamiseks kataboolsete protsesside kaudu [36][37].

Aminohapped on vajalikud rakkude ja keha füsioloogiliste protsesside normaalseks toimimiseks, näiteks osalevad aminohapped või nende derivaadid immuunsüsteemi funktsioneerimise tagamises, rakkudevahelises signaaliüleandes ning on vajalikud hormoonide ja nukleotiidide sünteesimiseks [37].

Erinevatel aminohapetel on eraldiseivad katabolismirajad, kuid lõplik aminohapete oksüdeerumine toimub kõigil aminohapetel tsitraaditsükli [36]. Mitmed aminohapete katabolismi käigus tekkinud metaboliidid on seejuures ureemilised toksiinid, nt urea, kusihape, ammoonium või ureemiliste toksiinide eelühendid, nt indool ja p-kresool [29][36][38][39]. Lisaks inimesepoolsele aminohapete metabolismile sõltub aminohapete metabolismiga tekkivate ureemiliste toksiinide hulk ja koostis soolestiku mikroobikooslusest [38].

Eluks vajalikud aminohapped saab inimene valkudena söögist. Söögist omastatakse 20 erinevat, standardse geneetilise koodi alusel sünteesitavat aminohapet, millest 9 on asendamatud aminohapped: fenüülalaniin, histidiin, isoleutsiin, leutsiin, lüsiin, metioniin, treoniin, trüptofaan, valiin ja 11 on asendatavad aminohapped: alaliin, arginiin, aspartaat, tüsteiin, glutamaat, glutamiin, glütsiin, proliin, seriin, asparagiin [37][40]. Aminohapete kontsentratsiooni veres mõjutab dieet, sugu, vanus, metabolism ning genotüüp [40][41]. Dieedi kõige suuremat mõju on täheldatud lüsiini, metioniini, trüptofaani,alaniini, türosiini ja glütsiini kontsentratsioonile vereseerumis [40].

Vereplasma aminohapete kontsentratsiooni reguleerivad homöostaatiliselt mitmed hormoonid: insuliin, insuliinisarnane kasvufaktor-1, kasvuhormoon, glükagoon, kortisool, parathormoon, jt [3][41]. Aminohapete hulka veres reguleeritakse verre eralduvate ja verest eemaldatavate aminohapete hulga kontrollimisega. Aminohapped eralduvad verre seedimise käigus, valkude lagundamisel ning rakkude poolt vabastamisel. Aminohapete eemaldamine verest on peamiselt seotult valkude sünteesiga, aminohapete oksüdatsiooniga ja metabolismiga [41].

Uriiniga väljutatav aminohapete hulk on seejuures tühine, esmauriini eritatud aminohapetest resorbeerub verre tagasi 99% aminohapetest [42].

KNP diagnoosiga kaasnevad enamasti põletikulised haigused, hormonaalsed häired, metaboolne atsidoos ja alatoitumine, mis kõik põhjustavad suurenenud valkude katabolismi, energiavarude, valkude ja aminohapete koguse vähenemist kehas, inglise keeles *protein energy wasting* [3][43][44][45].

Veres normaalse aminohapete kontsentratsiooni tagamiseks suurendatakse sellises olukorras skeletilihaste katabolismi, mis on keha suurim aminohapete reservuaar [46]. Sellega tagatakse kehas elutähtsate füsioloogiliste protsesside toimine, mis vajavad aminohappeid [37][47][48]. Pikaajaliselt suurenenud valkude katabolismiga kaasneb KNP-ga patsientidel lihaste atrofeerumine, vaimse tervise halvenemine, elukvaliteedi langus ning suureneb suremus [3][49][50][51].

Ka hemodialüüsravi suurendab eraldiseisvalt dialüüsravi saavatel patsientidel valkude ja aminohapete koguse vähenemist kehas. Iga dialüüsiseansi käigus eemaldatakse hemodialüüsiga patsiendi kehas lisaks ureemiliste toksiinidele ka peptiide, valke ja ligikaudu 6 – 15 g veres vabalt olevaid aminohappeid sõltuvalt raviseadistustest ja modaliteedist [3][52]. Samuti muutub aktiivsemaks lihaste ja valkude katabolism [44][48].

Valkude ja aminohapete kadude kompenseerimiseks soovitatakse dialüüsraivil olevatele patsientidele dieeti, mille valgusisaldus on 1,2 g/kg ja energiasisaldus 30–35 kcal/kg ühes päevas patsiendi kehakaalu kohta [47][53]. Soovitusliku valgu- ja energiakoguse tagamiseks võib kasutada toidule lisaks toidulisandeid ja dialüüsi ajal intravenoosselt infuseeritavaid toitainetega infusioonilahuseid [54][55]. Samas tuleb vältida liigset valkude ja aminohapete tarbimist, et vältida ülemäärast urea ja teiste ureemiliste toksiinide teket [36][37][56]. Ameerika Ühendriikides läbiviidud uuringus, millega jälgiti 2 aasta vältel dialüüsraivil olevate patsientide dieeti, leiti, et soovitusliku valgusisaldusega dieedist väiksema < 0,8 g/kg ja suurema > 1,4 g/kg valgusisaldusega dieet on seotud suurenenud patsientide suremusega [57].

## 2.5 Trüptofaan ja trüptofaani metaboliidid

Trüptofaan (Trp) on üks üheksast asendamatu aminohappest, mille molekulmass on 204 Da ning mida inimese organism iseseivalt ei produtseeri ja seega tuleb seda toidust omastada [36][37]. Trp on valkude koostises kõige harvemini esinev aminohape [40][58][59].

Trp-i päevane soovituslik dieedist saadav kogus on tervetel täiskasvanutel 4 mg/kg kehakaalu kohta [58]. Inimorganism kasutab Trp-i peamiselt valkude ja peptiidide sünteesimiseks, kuid samuti eelühendina mitmete biomolekulide sünteesimiseks [59][60]. Võrreldes tervete inimestega on hemodialüüsravi saavate patsientide Trp-i tase vereplasmas üle kahe korra väiksem ning Trp-i metaboliitide tase kõrgem [40][61][62][63][64].

Trp-i puudus organismis põhjustab patoloogilisi seisundeid närvisüsteemis, immuunsüsteemis, seedeelundkonnas ja muudes elundkondades [59][60]. Trp-i kliinilise olulisuse tõttu on Trp-i kontsentratsiooni määramiseks biovedelikes välja töötatud mitmeid meetodeid [65].

Teistest aminohapetest eristub Trp kõrvalahela kaudu, mis sisaldab fluorestseeruvat aromaatsset indoolijääki [60][66][67]. Lisaks Trp-le fluorestseeruvad aromaatsed aminohapped türosiin ja fenüülalaniin, mille emissioonispektrid osaliselt kattuvad. Neutraalse pH-ga vesilahuses on Trp-le omane valguse maksimaalne neeldumine lainepikkusel  $\lambda = 280$  nm ja emissioon lainepikkusel  $\lambda = 350$  nm. Nimetatud lainepikkustel on Trp aminohapetest domineerivaim fluorofoor [66][68]. Samuti on Trp ainus aminohape, mis seondub transportervalgu albumiiniga [41][60][69]. Tervetel inimestel on ligi 80 – 90% vereplasmas olevast Trp-st albumiiniga seondunud [63][70]. Sellest tulenevalt on vereplasmast rakkudele kättesaadav ainult albumiiniga mitteseondunud Trp-i osa (edaspidi vaba Trp) [41][69].

Trp-i katabolism kehas toimub inimese keharakkude ning soolestiku mikrofloora vahendusel. Eristatakse kolme ensüümide ja metabolismiproductide poolest erinevat Trp-i metabolismirada [59][71]. Inimese soolestikus kataboliseeritakse ligikaudu 95% Trp-st künurenriini metabolismiraja kaudu, mille käigus lagundatakse Trp-i indoolrühm, 4 – 6% indoolide metabolismiraja kaudu, mis on omane ainult soolestiku mikrofloorale ja 1 – 2% serotoniini metabolismiraja kaudu [59][60][64][71].

Kuigi Trp-i katabolismi käigus tekib metaboliite, mis on vajalikud elutähtsate biomolekulide, nt serotoniini, melatoniini, niatsiini, sünteesimiseks, on mitmed Trp-i metabolismi vahe- ja lõpp-produktid ureemilised toksiinid või nende eelühendid [60][64][72][73].

Trp-i metabolismiga seotud ureemilistest toksiinidest on enim käsitletud indoolide derivaate, mis vereplasmas valkudega seonduvad ja on dialüüsraviga raskesti eemaldatavad [30][38][73][64]. Seejuures fluorestseeruvad indoolirühma sisaldavad Trp-i metaboliidid sarnaselt Trp-le [10]. Käesolev töö keskendub Trp-i metaboliitidele indoksüül-3-sulfaat ja indool-3-äädikhape, mis on dialüüsi käigus peamised verest heitdialüsaati eemaldatavad fluorofoorid Trp-i kõrval ergastuslainepikkusel  $\lambda = 280$  nm ja emissiooni lainepikkusel  $\lambda = 350$  nm [10].

Molekulmassiga 213 Da indoksüül-3-sulfaat on valkudega seotud ureemiliste toksiinide markeraineks ning kõige enim uuritud ureemiline toksiin Trp-i metaboliitidest [29]. IS-i eelühendiks on indool, mis tekib Trp-i lagundamisel soolestiku mikroboomile omases indoolide metabolismirajas [64]. Soolestikust absorbeerub indool verre, mis maksa transportituna esmalt indoksüülilis oksüdeeritakse ja sulfoneerimise järel indoksüül-3-sulfaadiks metaboliseeritakse [74]. Väiksem osa indoksüülilist konjugeeritakse seejuures maksas glükuroonhappega ja tekib indoksüülglükuroniid [74]. IS on veres ligi 90% ulatuses albumiiniga seondunud, mis raskendab IS eemaldamist hemodialüüsiga [75][76]. Suurenenud IS-i kogus veres põhjustab kardiovaskulaarseid probleeme, põletikku ning neerukahjustusi [29][31][64][75].

Molekulmassiga 175 Da indool-3-äädikhape (IAA) on ureemiline toksiin, mida produtseeritakse peamiselt soolestiku mikrofloora poolt indoolist ning väiksemal määral inimorganismi kudedes trüptamiinist [64][77][78]. Sarnaselt indoksüül-3-sulfaadile põhjustab kõrge IAA kontsentratsioon veres sama mehhanismi kaudu kardiovaskulaarseid ja põletikuga seotud probleeme [29][64], lisaks sellele inhibeerib IAA jääkainete metabolismi [64]. IAA seondub samuti veres albumiiniga, kuid ligi 70% ulatuses [76].

Dialüüsravi eesmärk on ureemilised toksiinid kehast eemaldada, vältides samal ajal kehale vajalike ühendite eemaldamist. Dialüüsravi eesmärkide täitmise jälgimiseks tuleb seega hinnata eemaldatud ureemiliste toksiinide kogust ja eemaldamise tõhusust.

## 2.6 Hemodialüüsravi kvaliteedi hindamine

Dialüüsravi tõhusust ja ravidoosi hinnatakse markermolekulide eemaldamise järgi hemodialüüsil. *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (KDOQI) kliiniliste juhiste järgi soovitatakse hemodialüüsi kvaliteeti hinnata vähemalt korra ühes kuus vereproovide alusel [4].

Ajalooliselt on dialüüsravi doosi ja kvaliteedi määramisel markermolekulina enim kasutatud ureat [7], mis on valkude katabolismi lõpp-produkt ning kõige suuremas koguses kehasse kogunev ureemiline toksiin [29][30][37].

Kõige kasutatavam dialüüsi kvaliteedi hindamise parameeter on urea eemaldamisel põhinev  $Kt/V$  [4][79], mis arvutatakse järgnevalt:

$$\frac{Kt}{V} = \ln \frac{C_t}{C_0}, \quad (1)$$

kus  $K$  on dialüsaatori urea eemaldamise efektiivsus [ml/min],  $t$  dialüüsi kestus minutites,  $V$  patsiendi kehavedeliku hulk [mL],  $C_0$  ja  $C_t$  on vastavalt urea kontsentratsioon veres dialüüsieelselt ja dialüüsi lõpus [mmol/L]. KDOQI soovituslik dialüüsiseansi  $Kt/V$  väärtus on 1,4 [4].

Kõige lihtsam on dialüüsravi doosi hinnata dialüüsi käigus eemaldatud urea ainehulga järgi algkontsentratsiooni suhtes, inglise keeles *removal rate* (RR) [5][80], mis arvutatakse järgnevalt:

$$RR = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100 \%, \quad (2)$$

kus  $C_0$  on urea kontsentratsioon veres dialüüsieelselt ja  $C_t$  urea kontsentratsioon dialüüsi lõpus [mmol/L].

Lisaks vereproovidel põhinevatele kaudsetele meetoditele on dialüüsravi kvaliteeti võimalik hinnata otseselt heitdialüsaadis olevate ainete kontsentratsiooni alusel [81]. Üks selline parameeter on dialüüsi käigus eemaldatud ainete koguhulk, inglise keeles *total removed solute* (TRS).

TRS leitakse järgmise valemiga [5]:

$$TRS = V_T \times C_T, \quad (3)$$

kus  $V_T$  on dialüüsi vältel tekkinud heitdialüsaadi koguruumala [L] ning  $C_T$  ureemilise ühendi keskmine kontsentratsioon heitdialüsaadis [mmol/L].

Kuigi uureal põhinevate parameetrite kasutamine aitab hinnata dialüüsravi doosi, ei saa uureal põhinevate parameetrite põhjal teha järeldusi dialüüsi kogukvaliteedi kohta [7][81], sest urea eemaldamise kineetika erineb valkudega seotud ja keskmise suurusega ureemiliste ühendite eemaldamise kineetikast [5][6][7][32]. Samuti on probleemne pikk ajaperiood, mille järel hemodiaalüüsi ravidoosi hinnatakse, millest tulenevalt puudub informatsioon üksikute dialüüsiseansside ravi kvaliteedi kohta [81]. Seetõttu on hemodialüüsi kvaliteedi hindamisel efektiivsem kasutada optilisi meetodeid, mis võimaldavad jälgida reaalaajas erinevate ureemiliste toksiinide eemaldumist heitdialüsaati dialüüsiseansi käigus [8][9].

Hetkel igapäevases kliinilises praktikas kasutatavad optilised sensorid võimaldavad jälgida väikeste vees lahustuvate molekulide eemaldamist heitdialüsaati kusihaape ultravioletse kiirguse (UV) neelduvuse järgi, millest on võimalik tuletada  $Kt/V$  väärtus [82][83]. Erinevate ureemiliste toksiinide rühmadesse kuuluvate ühendite eemaldamise samaaegselt jälgimiseks arendatakse Optofluid Technologies OÜ poolt UV-neelduvusel ja fluorestsentsil põhinevat multikomponentset sensorit [8][9][10][84]. Seejuures on heitdialüsaati eemaldatud valkudega seonduvate molekulide fluorestsents ergastuslainepikkusel  $\lambda = 280$  nm ja emissioon lainepikkusel  $\lambda = 350$  nm peamiselt tingitud Trp-st ja Trp-i metaboliitidest [10], millest tulenevalt on heitdialüsaadi fluorestsentsi mõõtmine mainitud lainepikkustel suure potentsiaaliga valkudega seonduvate molekulide eemaldamise koguse hindamiseks dialüüsiseansi käigus. Fluorestsentsisignaali interpreteerimiseks on aga oluline mõista nende ühendite eemaldamist verest heitdialüsaati dialüüsiseansi käigus ning dialüüsiseansi adistustest tulenevat mõju nende ainete eemaldamisele.

## 2.7 Ureemiliste toksiinide analüüsimeetodid

Ureemiliste toksiinide analüüsiks laboratoorses diagnostikas on palju erinevaid meetodeid, nt kromatograafia, spektrofotomeetria, fluoromeetria, kemoluminomeetria, nefelomeetria, radioimmunomeetria, tuuma magnetresonantsomograafia, massi spektromeetria, ensümaatilised, immuno- ja elektrokeemilised meetodid. Ureemilise toksiooni analüüsiks meetodi valimisel lähtutakse meetodi spetsiifilisusest uuritava ureemilise toksiooni suhtes ning mõõtetäpsusest [31][85].

Kuivõrd kasutatavast meetodist sõltub ureemiliste toksiinide kvantifitseerimise täpsus, peavad rutiinses kliinilises praktikas kasutatavad meetodid olema sobilikud kõikide patsientide jaoks ning täpselt defineeritud [85].

Kõige enam rutiinselt analüüsitud ureemiline toksiin on urea [4][79]. Urea koguse määramisel kasutatakse põhiliselt ensümaatilise meetodiga kombineeritult spektrofotomeetria ning harvem elektrokeemilisi meetodeid nagu konduktomeetria või potentsiomeetria [86][87][88][89]. Urea koguse määramiseks kasutatakse urea spetsiifilist ensüümi ureaas, mis katalüüsib urea lagunemist ammoniumiks ning süsihappegaasiks [86][87][88]. Tekkinud ammoniumioonid suurendavad uuritava biovedeliku juhtivust ning võimaldavad seeläbi urea kontsentratsiooni hinnata [89]. Spektrofotomeetria kasutades lisatakse ensüümreaktsiooni produktide värvimiseks lahusesse keemilisi reagente [86][87][88]. Ensümaatiliste reaktsioonide substraadispetsiifilisus tagab ensümaatiliste meetodite hea mõõtetäpsuse urea koguse suhtes (variatsioonikordaja < 5%) [90][91][92].

Käesolevas töös uuritud indoolide derivaatide IS ja IAA analüüsiks kasutatakse peamiselt kõrgsurvevedelikkromatograafiat, kuid mõlema jaoks on olemas ka ensümaatilise meetodiga kombineeritud spektrofotomeetrilised meetodid [31][92][93]. Viimased on rutiinsetes analüüsides lihtsamini rakendatavad ja odavamad, kuid vähetatsemad [92][93]. Lisaks paremale mõõtetäpsusele võimaldab kõrgsurvevedelikkromatograafia määrata indoolide derivaate samaaegselt ühest proovist ning vähendada seeläbi erinevate analüüsides arvu ja selle käigus tekkivaid vigu [10][94].

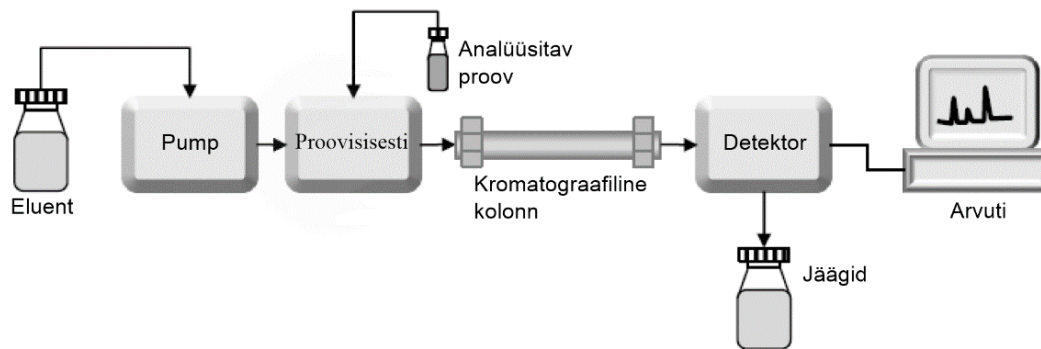


## 2.8 Kõrgsurvevedelikkromatograafia

Kõrgsurvevedelikkromatograafia, inglise keeles *high-performance liquid chromatography*, (HPLC) on meetod ainete lahutamiseks, detekteerimiseks ja kvantifitseerimiseks ainete segust. Ainete lahutamiseks kasutatakse statsionaarset faasi, mida kõrgel rõhul läbib vedel mobiilne faas ehk eluent, millega kantakse ainete segu läbi statsionaarse faasi [95]. Statsionaarse faasina kasutatakse kromatograafilisse kolonni maatriksina lisatud peeneteralisi osakesi diameetriga  $<5 \mu\text{m}$ , mis tekitavad suure mehaanilise takistuse kõrgel rõhul kolonni läbivale mobiilsele faasile ja selles olevatele ainetele [95][96].

Analüüdi ja statsionaarse faasi interaktsioonide tugevusest sõltuvalt läbivad mõned ained statsionaarset faasi kiiremini kui teised, mille tõttu toimub ainete segu komponentide lahutamine [97]. Kromatograafiasüsteemi konkreetse aine lahutamise selektiivsus ja efektiivsus sõltub peamiselt kolonni maatriksi omadustest: polaarsusest, hüdrofoobsusest, ioonsusest, poorsusest ja struktuurist [95][96][98]. Erinevate keemiliste ja füüsikaliste omadustega ainete samaaegseks efektiivseks lahutamiseks on võimalik kasutada mitut järjestikust kolonni või eluendina mitme lahusti süsteemi [98]. Ligi 90% HPLC analüüsides tehakse mittepolaarsete pöördfaasi kolonnidega, mille korral kasutatakse eluendina polaarset vee ja mõne orgaanilise lahusti, nt metanooli või atsetonitriili, segu [96].

HPLC analüüside tegemiseks kasutatava kromatograafi põhikomponendid on pump, proovisisesti, kromatograafiakolonn, detektor ning arvuti (Joonis 2, lk 26). Kromatograafi pumba eesmärk on tagada pidev ühtlane eluendi vool läbi kromatograafilise kolonni kõrgel rõhul kuni 1300 bar-i [99]. Pumbad tekitavad gradiente ka mitmest erinevast lahustist, mis lubab kasutada kompleksseid meetodeid ainete lahutamiseks [99]. Proovisisesti süstib uuritava proovi kapillaari, kust proovis sisalduvad ained eluendiga kromatograafilisse kolonni suunatakse [99]. Kromatograafilist kolonni hoitakse konstantsel temperatuuril ning seal toimub ainete lahutamine sõltuvalt kolonni, eluendi ja analüüdi interaktsioonidest [96][97]. Kolonnist väljunud ained määratakse ja kvantifitseeritakse detektoriga ning saadud andmeid töödeldakse arvutiga, mis kontrollib ühtlasi kromatograafi tööd.



Joonis 2. Kõrgsurve vedelikkromatograafia süsteemi põhikomponendid. Pump tagab pideva eluendi voolu läbi kromatograafilise kolonni. Proovisisesti suunab analüüsitava proovi eluendiga kromatograafilisse kolonni, kus proovis sisalduvad ained teineteisest lahutatakse. Kolonnist väljunud aine detekteeritakse näiteks UV-VIS detektoriga ning saadud andmeid töödeldakse arvutis ([97] järgi).

Kromatograafilisest kolonnist väljunud lahutatud ainete detekteerimiseks ja kvantifitseerimiseks kasutatakse põhiliselt optilisi meetodeid ja massispektrometriat, [97][99]. Kõige levinumad on ultravioletse ja nähtava valguse (UV-VIS) spektrofotomeetriselised detektorid, mis on odavad ning universaalsed [100]. UV-VIS fotodiodrivi detektorid võimaldavad mõõta ainete valguse neeldumist terve nähtava valguse spektri ulatuses samaaegselt [101]. Kuigi fluorestsentsdetektorid, mille kasutamine eeldab konkreetsete ergastuslainepikkuste eelnevat defineerimist, on tundlikumad kui UV-VIS spektrofotomeetrid, siis on fluorestsents omane vähestele biovedelikes leiduvatele komponentidele [97][100]. Selle omaduse eelisena võib näha suuremat selektiivsust.

Kõik käesolevas töös uuritavad Trp-i metaboliidid ja Trp on fluorestsentsdetektoritega tuvastatavad ja kvantifitseeritavad [100].

Kuna optilised meetodid on mittedestruktiivsed, saab kromatograafiasüsteemis mitut järjestikust optilist detektorit kasutada. Optiliste detektorite järele võib kromatograafiasüsteemi lisada ka massispektrometri, millega saab ioniseeritavaid ühendeid täiendavalt massi ja laengu suhte kaudu detekteerida [97][98][100].

Spektrofotomeetriliste detektoritega ainete kvantifitseerimise aluseks on Bouguer'-Lambert-Beer'i seaduspärasus, mille järgi on uuritava lahuse valguse neelduvus  $A(\lambda)$  võrdne aine kontsentratsiooni  $c$  [M], optilise teepikkuse  $d$  [cm] ja molaarse neeldumisteguri  $\varepsilon$  [cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>] korrutisega lainepikkusel  $\lambda$ .

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon(\lambda) \times c \times d, \quad (4)$$

$I_0$  on mõõtekambrile ja selles olevale proovile langeva valguse intensiivsus [W] ja  $I$  valguse intensiivsus pärast mõõtekambris oleva lahuse läbimist [W]. Seejuures muutuvad eri lainepikkustel ainete neeldumistegurid ja seega ka kogu lahuse neelduvus [101]. Lineaarse sõltuvuse säilimiseks aine kontsentratsiooni ja valguse neelduvuse vahel ei tohi mõõdetavas lahuses oleva uuritava aine kontsentratsioon ületada kriitilist piiri. Liiga kõrge kontsentratsiooniga lahustes võivad ained hakata dimeriseeruma ja omavahel sidemeid moodustama, mis muudab ainete molaarset neeldumistegurit [101].

Fluorestsentsi intensiivsus  $I_F$  [W] on proportsionaalne fluorofoori kvantsaagise  $\varphi$ , fluorofoori molaarse neeldumisteguri  $\varepsilon$  [cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>] ning valguse intensiivsuse  $I_{ex}$  korrutisega ergastuslainepikkusel  $\lambda$  [W].

$$I_F \propto \varphi \times \varepsilon(\lambda) \times I_{ex}, \quad (5)$$

Fluorestsentsi mõõtmise puhul tuleb arvestada võimaliku sisefiltri efektiga, mis mõjutab fluorestsentsi intensiivsuse ja fluorofoori kontsentratsiooni vahelist funktsionaalset lineaarset sõltuvust. Primaarse sisefiltri efekti korral neelavad lahuses olevad kromofoorid valguse ergastaval lainepikkusel, mille tõttu väheneb fluorofooride ergastamine. Sekundaarse sisefiltri efekti korral fluorofooride emiteeritud kiirgusest osa neeldub lahuses olevates kromofoorides. Sellest tulenevalt hinnatakse reaalselt lahuses olevat fluorofooride kontsentratsiooni madalamalt. Sisefiltri efektist tingitud mõõtevigu on võimalik vähendada matemaatiliste meetoditega või efektiivse kromofooride ja fluorofooride lahutamiseiga kromatograafiakolonnis [102].

### 3 Töö eesmärk

Käesoleva magistr töö eesmärk oli hinnata dialüüsravi mõju Trp-i ja Trp-i metaboliitide eemaldamisele kroonilise neerupuudulikkusega patsientide ravil dialüüsravi seadistuste ja modaliteedi põhised. Töö käigus prooviti vastata järgnevatele küsimustele: milline on Trp-i, IS-i ja IAA omavaheliste kontsentratsioonide seos? Kuidas mõjutab dialüüsravi Trp taset veres? Kuidas eemalduvad verest Trp-i metaboliidid dialüüsravi ajal eri modaliteetide ja raviseadistuste korral? Kuidas muutub veres valkudega seotud ja vabade ureemiliste toksiinide suhe dialüüsi käigus?

Töö hüpotees oli, et Trp-i ja Trp-i metaboliitide eemaldamise efektiivsus ja tasemete muutus dialüüsravi käigus sõltub dialüüsravi seadistustest.

Töös püstitati järgnevad ülesanded:

- 1) määrata HPLC abil Trp-i ja Trp-i metaboliitide kontsentratsioonid dialüüsravi vältel kogutud vere- ja heitdialüsaadi proovides;
- 2) arvutada verest ainete eemaldumise suhted algkontsentratsiooni osas erinevatel ajapunktidel võetud proovide alusel;
- 3) leida verest eemaldatud ainete koguhulk;
- 4) leida Trp-i, IS-i ja valkudega seondumise määr veres erinevatel ajapunktidel võetud proovide alusel;
- 5) hinnata tulemuste statistilist olulisust.

## 4 Metoodika

### 4.1 Patsientide valim ja dialüüsravi seadistused

Käesolev magistritöö põhineb OLDIAS 2 [11] kliinilise uuringu käigus kogutud vere- ja heitdialüsaadi proovide dialüüsijärgsel analüüsimisel kõrgsurvedelik kromatograafia. Kliinilise uuringu ülesehitust on täpsemalt kirjeldatud magistritöö ettevalmistamise käigus tehtud katsete tulemuste ja nende analüüsi põhjal avaldatud teadusartiklis [12].

Uuringus osales 78 erinevat patsienti (vt Tabel 1), kellele teostati neli erineva raviseadistuse ja modaliteediga dialüüsiseansi (vt Tabel 2, lk 30). Dialüüsiseansid teostati järjestikustel nädalatel nädala keskmise dialüüsina.

Kliinilises uuringus osalenud 78 patsienti jaotusid nelja erineva dialüüsikeskuse vahele järgmiselt: 22 patsienti Tallinn, Eesti (keskus 1); 21 patsienti Linköping, Rootsi (keskus 2); 15 patsienti Gent, Belgia (keskus 3); 20 patsienti Madrid, Hispaania (keskus 4) [12].

Tabel 1. Uuringus osalenud patsientide valimi kliinilised andmed. Keskväärtused on esitatud mediaani ja alumise ning ülemise kvartiili vahemikuna [12].

Parameeter	Väärtused
Sugu	60 mehed, 18 naised
Vanus aastates	66 (54 – 76 )
Kehamassiindeks, kg/m <sup>2</sup>	25,7 (23,1 – 29,8)
Ultrafiltratsiooni ruumala, mL	2200 (1500 – 3000)
Residuaalne diurees, n (%)	30 (38%).
Dialüüsi ligipääs, n	natiivne fistul (64), siirdatud fistul (11), kateeter (3)
Dialüüsi staaž kuudes	37 (17 – 73)

Patsientide uuringusse sobivuse kriteeriumiteks oli vanus > 18 aasta, hemodialüüsi sagedus kolm korda nädalas kestusega 3,5 – 4,5 h seansi kohta, verevool läbi fistuli > 300 mL/min, arstide poolt hinnatud eeldatav eluiga üle kuue kuu ning nakkushaigustele ja akuutsusele viitavate sümptomite puudumine [12].

Ureemiliste toksiinide ja Trp-i eemaldamise efektiivsuse uurimiseks dialüüsravi kasutati järgnevaid modaliteete ja raviseadistusi (vt Tabel 2): “Standard” dialüüsravi, mis oli patsiendile kliiniliselt määratud rutiinselt rakendatav ravi; “LowHD” oli minimaalsete dialüüsiseadistustega tavapärane hemodialüüsravi; “MediumHDF” üldiselt keskmiste väärtustega, aga dialüsaatori efektiivpindala ning dialüsaadi (d) ja verevoo (v) suhte osas (Qd/Qv) suurima raviseadistusega dialüüsravi; “HighHDF” oli suurimate raviseadistusega dialüüsravi dialüsaatori efektiivpindala ning asendatud vereplasma ruumala (Vs) osas [12].

Tabel 2. Ureemiliste toksiinide eemaldamise efektiivsuse analüüsimiseks kasutatud raviseadistused ja modaliteedid. Dialüüsravi käigus kasutatud filtrite tüübid ning nende membraanide efektiivsed pindalad on kirjeldatud tabeli allmärgusena.

Raviseadistus	Standard	LowHD	MediumHDF	HighHDF
Modaliteet	HD/HDF	HD	HDF	HDF
Vs, L	23,0 ± 3,5	0	16,4 ± 3,0	24,6 ± 4,0
Aeg, min	240	240	240	240
Qv, mL/min	323 ± 40	200 ± 10	306 ± 62	378 ± 30
Qd, mL/min	458 ± 63	301 ± 11	793 ± 57	793 ± 47
Filtri pindala <sup>1</sup> , m <sup>2</sup>	1,90 ± 0,20	1,62 ± 0,19	2,13 ± 0,13	2,13 ± 0,14
Dialüüsiseansse kokku	n = 78	n = 78	n = 78	n = 78

<sup>1</sup> “Standard”: FX60 (n = 6), FX80 (n = 6), FX800 (n = 30), FX1000 (n = 12), Polyflux210H (n = 12), Solacea 19H (n = 1), Elisio-19H (n = 9). “LowHD”: Lo15 (n = 20), FX60 (n = 37), FX1000 (n = 1), Revaclear300 (n = 19), Solacea 15H (n = 1). “MediumHDF”: FX800 (n = 9), FX1000 (n = 56), Polyflux210H (n = 12), Solacea 21H (n = 1). “HighHDF”: FX800 (n = 11), FX1000 (n = 56), Solacea 21H (n = 1), Polyflux210H (n = 10). Dialüsaatorite membraanide efektiivsed pindalad olid järgnevad: FX60 1,4 m<sup>2</sup>, FX80 1,8 m<sup>2</sup>, FX800 1,8 m<sup>2</sup>, FX1000 2,2 m<sup>2</sup>, Solacea 15H 1,5 m<sup>2</sup>, Solacea 19H 1,9 m<sup>2</sup>, Solacea 21H 1,9 m<sup>2</sup>, Elisio 19H 1,9 m<sup>2</sup>, Polyflux 210H 2,1 m<sup>2</sup>, Revaclear 300 1,4 m<sup>2</sup>, Xevonta LO 15 1,5 m<sup>2</sup>.

Hemodialüüs teostati 76 patsiendile Fresenius 5008 seadmega (304 dialüüsi), ühele patsiendile Fresenius 4008 seadmega (4 dialüüsi) ja ühele patsiendile Fresenius 6008 seadmega (4 dialüüsi) (Fresenius Medical Care, Saksamaa) [12].

## 4.2 Analüüsitavad proovid

Ureemiliste toksiinide eemaldamise efektiivsuse hindamiseks dialüüsravil koguti dialüüsi vältel patsiendilt vereproove ning dialüüsimasina äravoolutorust heitdialüsaadi proove.

Vereproovid koguti vahetult enne dialüüsi algust (0 minuti proov), 60. minutil pärast dialüüsi algust (60 minuti proov), dialüüsi lõpus (240 minuti proov) ning 30 minutit pärast dialüüsi lõppu (30 post proov). Kõik vereproovid võeti arteriaalsest vereliinist enne dialüsaatori läbimist [12].

Heitdialüsaadi proovid koguti dialüüsimasina äravoolutorust 7.; 60.; 120. ja 180. minutil pärast dialüüsi algust ning dialüüsiseansi lõpus 240. minutil. Lisaks koguti terve dialüüsiseansi käigus tekkinud heitdialüsaat suurde tanki dialüüsi käigus eemaldatud ureemiliste toksiinide ja Trp-i koguhulga määramiseks. Dialüüsiseansi lõpus tank kaaluti ning heitdialüsaati segati hoolikalt, mille järel võeti tankist proov [12].

Kõik dialüüsiseansi ajal kogutud proovid jagati kaheks alikvoodiks, millest üks alikvoot saadeti kohaliku kliinilisse laborisse standardsete analüüside teostamiseks ning teine alikvoot Tallinna Tehnikaülikooli käesoleva magistritöö raames analüüsimiseks [12].

Pärast vereproovide kogumist hoiti vereproove koaguleerimiseks 30 minutit toatemperatuuril ja tsentrifuugiti seejärel 2-16KL tsentrifuugiga (Sigma-Laborzentrifugen, Saksamaa) 20 min 11192 kiikrootoriga 3000 g juures. Keskuses 1 transporditi üks tsentrifuugitud veretuub kliinilisse laborisse analüüsiks ning teine Tallinna Tehnikaülikooli, kus tsentrifuugitud vereproovist eemaldati seerum. Keskustes 2, 3 ja 4 eraldati tsentrifuugitud, Tallinna Tehnikaülikooli saadetavast, vereproovist vereseerum, mis pipeteeriti 2 mL krüotuubidesse ning hoiustati sarnaselt heitdialüsaadi proovidele ultrasügavkülmikus (-75 °C) enne Tallinna Tehnikaülikooli analüüsimiseks saatmist. Tallinna Tehnikaülikoolis proovid sulatati ning töödeldi sarnaselt keskuses 1 kogutud proovidega HPLC abil Trp-i ja Trp-i metaboliitide koguse määramiseks proovides [12].

### **4.3 Vereseerumi- ja heitdialüsaadi proovide ettevalmistus**

Vereseerumis ureemiliste toksiinide ning Trp-i koguhulga ja valkudega mitteseondunud vaba osa kontsentratsiooni määramiseks HPLC-ga töödeldi vereseerumi proove enne analüüsimist eraldi kahes grupis [12].

Ureemiliste toksiinide ja Trp-i koguhulga määramiseks lahjendati seerumiproove 1:3 füsioloogilise soolalahusega Protein LoBind 1,5 mL tuubides (Eppendorf, Saksamaa) ja proove homogeniseeriti MS3 keerisseguriga 1 min 1500 rpm (IKA-Werke, Saksamaa). Seejärel kuumutati proove 30 min UFB400 kuumutusahjus 95 °C juures (Memmert, Saksamaa) ning kiirjahutati 4 °C vesivannis, millele järgnes tsentrifuugimine 2-16KL tsentrifuugiga 10 min 37 °C juures 12132 rootoriga raskuskiirendusega 21 900 g (Sigma-Laborzentrifugen, Saksamaa) denatureerinud valkude sadestumiseks. Saadud supernatant pipeteeriti filtrile tsentrifuugiga ultrafiltreerimiseks [12].

Valkudega mitteseondunud ureemiliste toksiinide vaba osa määramiseks seerumiproove enne ultrafiltreerimist ei töödeldud. Ultrafiltreerimiseks pipeteeriti 400 µL supernatanti või vereseerumit Vivacon 30 kDa molekulmassi piiriga filtritele (Sartorius, Saksamaa) ning tsentrifuugiti 37 °C juures raskuskiirendusega 14 000 g 3 h. Ultrafiltreerimisele eelnes filtrite läbipesu 400 µL ultrapuhhta veega, mille jaoks filtreid tsentrifuugiti 15 min raskuskiirendusega 14 000 g 37 °C juures. Ultrafiltreerimise järel saadud ca 250 µL filtraadile lisati üks µL 99% metaanhapet ureemiliste hapete, eriti kusihappe viimiseks dissotsieerumata vormile. Edasiseks analüüsimiseks HPLC-ga pipeteeriti filtraat 200 µL viaalidesse. Filtraadiga viaale hoiustati enne analüüsimist temperatuuril 1°C mitte kauem kui 72 h. Heitdialüsaadi proovide analüüsimiseks lisati 5 mL-le heitdialüsaadile 10 µL 99% metaanhapet ning asetati seejärel sarnaselt seerumiproovidele 200 µL viaalidesse edasiseks analüüsimiseks [12].

### **4.4 Kasutatud lahused**

Puhverlahuste valmistamiseks kasutati ASTM standardi tüüp 1 ultrapuhast deioniseeritud vett eritakistusega  $> 18,2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$  temperatuuril 25 °C, mis toodeti pöördosomoos veepuhastusseadmega destilleeritud veest (Millipore Synergy UV, USA). Orgaanilise lahustisegu valmistamiseks kasutati HPLC puhtusklassiga ( $> 99,9\%$ ) metanooli ja atsetonitriili (Honeywell, USA).



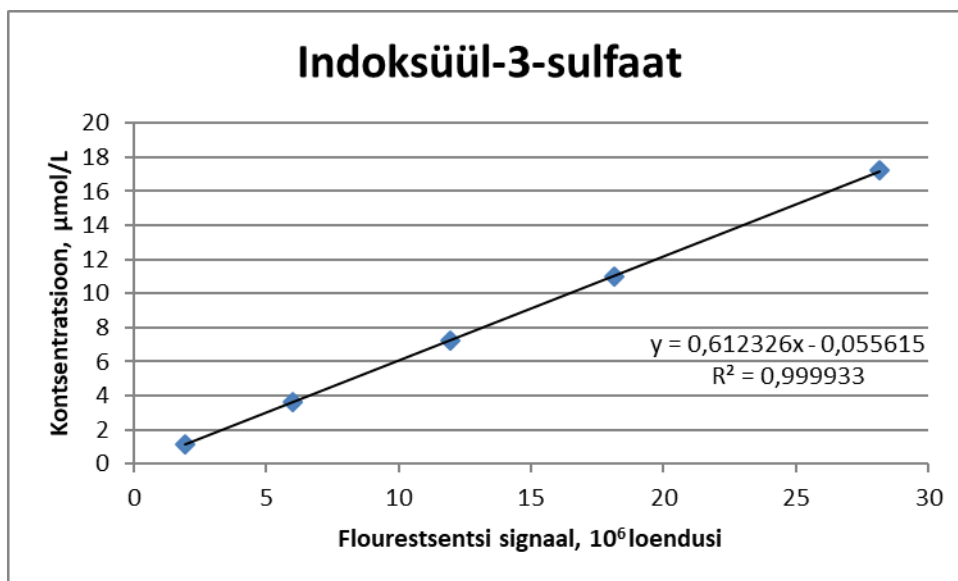
Teiste töös kasutatud lahuste tootjad olid järgnevad: metaanhape (Sigma-Adrich, USA), ammoonium hüdroksiid (Honeywell, USA), füsioloogilise lahuse valmistamiseks kasutatud naatriumkloriid (Sigma-Adrich, USA), ammooniummetanaat (VWR International, Belgia). Kromatograafi kalibreerimiseks kasutatud standardlahused valmistati etalonainetest puhtusastmega > 98% (Sigma-Adrich, USA). Kõikide lahuste valmistamisel kasutati ainete kaalumiseks analüütilist kaalu XP205 (Mettler Toledo, Suurbritannia).

#### **4.5 Ureemiliste toksiinide analüüs HPLC-ga**

Kromatograafiliste analüüside läbiviimiseks kasutati Ultimate 3000 kõrgsurve vedelikkromatograafi (Thermo Scientific, USA) ning varasemalt vanemteadur Jürgen Arundi poolt välja töötatud meetodikat [100]. Kromatograafisüsteem sisaldas järjestikku järgnevaid mooduleid: degasaator SRD-3600, pumbasüsteem DGP-3600 RS, termostateeritud proovisisesti WPS-3000 TCL, kolonni termostaat TCC-3000 RS, spektrofotomeetriline fotodiood jadadetektor DAD-3000 RS, fluorestsentsi detektor FLD-3400 RS. Kromatograafiliste kollonnidena kasutati kahte järjestikust Poroshell 120 C18 4.6 x 150 mm kolonni ning eelkolonnina Poroshell 120 C18 4.6 x 3 mm, mis olid termostateeritud temperatuuril 40 °C (Agilent Instruments, USA) [12].

Kromatografeerimisel kasutati eluendina 0,05 M metaanhappe ja ammooniumhüdroksiidi puhverlahust, mille pH oli 4,25 (A) ning 0,05 M ammooniummetanaat metanooli 9:1 suhtega atsetonitriili orgaanilise lahusti (B) segu. Eluendi voolukiirus oli kromatografeerimise vältel 0,6 mL/min ning eluendi koostist muudeti kolmeastmelise lineaarse gradiendiprogrammiga. Saadud kromatogramme ja andmeid töödeldi Chromeleon 7.1 tarkvaraga (Thermoc Scientific, USA) [12].

Käesolevas töös kromatograafi kalibreerimiseks kasutatud standardlahused valmistati vanemteadur Jürgen Arundi poolt määratavate ureemiliste toksiinide ja Trp etalonainete lahustamisega ultrapuhtas vees. Standardlahuseid ultrasonikeeriti 30 min ultrahelivannis DT 255 H (Bandelin, Saksamaa) etalonainete täielikuks lahustamiseks. Standardlahuseid analüüsiti seejärel HPLC-ga eeltoodud meetodika järgi ning kromatogrammidele määratud piikide pindalade ja teadaoleva standardlahuse kontsentratsiooni abil koostati uuritavatele ainetele kalibreerimiskõverad (vt Joonis 3) [12].



Joonis 3. Indoksüül-3-sulfaadi standardlahuste analüüsimisel saadud kalibreerimisgraafik. Kalibreerimiskõvera kirjeldavat regressioonivõrrandit kasutati ureemiliste toksiinide kontsentratsiooni määramiseks analüüsitavates proovides.

Töö käigus kogutud vere- ja dialüsaadi proovides ureemiliste toksiinide ja Trp-i koguse määramiseks analüüsiti ettevalmistatud proove HPLC-ga. Saadud kromatogrammidelt (vt Lisa 1) määratud ureemilist toksiooni iseloomustava piigi pindala ning kalibreerimiskõvera kaudu leitud regressioonivõrrandi järgi arvutati aine kontsentratsioon uuritavas proovis. Saadud tulemustest koostati andmete edasiseks analüüsimiseks Exceli andmetabel.

Tulemusi kontrolliti võimalike vigade tekkimise suhtes kliinilise labori ja magistritöö käigus teostatud analüüside tulemuste kokkulangevuse järgi. Vead tulenesid vales proovivõtust ja proovide märgistamisest. Kromatograafiasüsteemi ülemisest mõõtepiirist kontsentreeritumaid proove lahjendati ning analüüsi korrati. Kromatograafiasüsteemi alumiseks mõõtepiiriks võeti fluorestsentsi signaali-müra suhe 50:1. Kõikide analüüsitavate ainete kontsentratsiooni määramisel oli fluorestsentsi signaali-müra suhe suurem kui 50:1 [12].

Kõikidele dialüüsiseanssidele leiti vereseerumi ja heitdialüsaadi ureemiliste toksiinide ja Trp-i kontsentratsioonide põhjal valemi 2 (vt lk 22) järgi erinevates ajapunktides eemaldatud ainete suhteline hulk RR ning valemi 3 (vt lk 23) järgi dialüüsiseansi käigus eemaldatud ainete koguhulk TRS. Seejuures eeldati, et heitdialüsaadi keskmine tihedus tankis on  $1,008 \pm 0,001$  kg/L [12][103].

Valkudega seondunud Trp-i, IAA ja IS-i osakaal ainete koguhulga suhtes leiti järgneva valemi järgi:

$$PB = \frac{C_k - C_v}{C_k} \times 100 \%, \quad (6)$$

kus PB (*protein bound percentage*) on valkudega seondunud aine osakaal protsentides,  $C_v$  on aine vaba osa kontsentratsioon ja  $C_k$  on aine koguhulga kontsentratsioon kindlal ajapunktil võetud proovis.

Andmetöötluseks ning tulemuste statistiliseks hindamiseks kasutati MATLAB R2019b tarkvara (Mathworks, USA). Excelist andmete sisse lugemiseks MATLAB-i kasutati vanemteadur Kristjan Pilt poolt kirjutatud algoritmi. Ureemiliste toksiinide ja Trp-i kontsentratsioonide omavahelise sõltuvuse hindamiseks teostati lineaarne regressioonanalüüs Pearsoni korrelatsioonikordaja  $r$  määramiseks. Statistilise olulisuse hindamiseks kasutati sama patsiendi parameetrite võrdlemisel paariviisilist ja erinevate patsientide vahel võrdluse tegemiseks mittepaarilisi kahepoolseid Studenti  $t$ -teste. Statistiliseks oluliseks loeti tulemused, mille  $p < 0,05$  [12].

## 5 Tulemused

Töö käigus määrati Trp-i ja Trp-i metaboliitide kontsentratsioon üle 3000 heitdialüsaadi- ja vereproovis. Järgnevalt on kirjeldatud 78 patsiendi (vt Tabel 1, lk 29), kelle mediaanvanus oli 66 aastat ning kellest 77% olid mehed, andmete analüüsil põhinevaid tulemusi.

### 5.1 Trüptofaani ja trüptofaani metaboliitide dialüüsieelsed tasemed ja omavahelised seosed

Tabel 3 esitab eri dialüüsikeskuste patsientide dialüüsieelsed keskmised Trp-i ja Trp-i metaboliitide vaba osa ja koguhulga kontsentratsioonid [12].

Tabel 3. Patsientide dialüüsieelsed ureemiliste toksiinide ja Trp-i kontsentratsioonid veres. Trp-i ja Trp-i metaboliitide kontsentratsioonid on esitatud keskvärtuse ja standarddeviatsioonina ( $\mu\text{mol/L}$ ). Võrdluseks on lisatud urea kontsentratsioon veres ( $\text{mmol/L}$ ). Statistilised erinevused on märgitud järgnevalt: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  vs. keskus 1;  $^{\circ\circ}p < 0,001$ ;  $^{\circ}p < 0,01$ ;  $^{\circ}p < 0,05$  vs. keskus 2;  $^{\S}p < 0,001$  vs. keskus 3.

	Aine	Kõik ( $n = 78$ )	Keskus 1 ( $n = 22$ )	Keskus 2 ( $n = 21$ )	Keskus 3 ( $n = 15$ )	Keskus 4 ( $n = 20$ )
Koguhulk	Trp	29,3 $\pm$ 8,0	29,00 $\pm$ 6,28	32,6 $\pm$ 9,7**	27,7 $\pm$ 8,8 $^{\circ\circ}$	27,3 $\pm$ 6,0 $^{\circ\circ\circ}$
	IS	107,6 $\pm$ 51,2	94,8 $\pm$ 47,6	121,4 $\pm$ 57,0**	98,5 $\pm$ 55,5 $^{\circ}$	113,6 $\pm$ 40,0**
	IAA	11,8 $\pm$ 9,2	13,5 $\pm$ 13,8	11,4 $\pm$ 5,9	11,3 $\pm$ 7,3	10,9 $\pm$ 6,7
Vaba osa	Trp	6,41 $\pm$ 2,07	6,22 $\pm$ 2,02	6,30 $\pm$ 1,63	5,54 $\pm$ 1,57*/ $^{\circ\circ}$	7,39 $\pm$ 2,50**/ $^{\circ\circ}/^{\S}$
	IS	14,7 $\pm$ 8,7	11,3 $\pm$ 5,8	15,0 $\pm$ 9,1**	12,7 $\pm$ 7,8	19,4 $\pm$ 9,4***/ $^{\circ\circ}/^{\S}$
	IAA	2,91 $\pm$ 2,00	3,08 $\pm$ 2,55	2,72 $\pm$ 1,68	2,61 $\pm$ 1,30	3,18 $\pm$ 2,06
	Uurea	19,1 $\pm$ 5,9	21,2 $\pm$ 7,3	16,8 $\pm$ 4,1***	18,7 $\pm$ 6,5*/ $^{\circ}$	19,6 $\pm$ 4,4 $^{\circ\circ\circ}$

Trp-i, IS-i ja urea kontsentratsioonid veres erinesid dialüüsikeskuste vahel mittedüstemaatilisel. Seejuures oli IAA kontsentratsioon eri keskuste patsientide veres dialüüsieelselt sarnane. Kõige enam varieerus veres vaba Trp-i kontsentratsiooni erinevate keskuste vahel. Kõige kõrgemad Trp-i ja IS-i tasemed olid teise keskuse patsientidel. Kõikide patsientide arvestuses oli kogu Trp-st  $23 \pm 8\%$  veres vabalt [12].

Patsientide dialüüsieelsete Trp-i ja ureemiliste toksiinide kontsentratsioonide vahelised seosed on näidatud Tabelis 4.

Tabel 4. Patsientide dialüüsieelsete ureemiliste toksiinide ja Trp-i kontsentratsioonide omavahelised statistilised seosed. Tabelis on esitatud lineaarsed korrelatsioonikordajad, statistiliselt olulised tulemused on märgitud punaselt. Negatiivse korrelatsiooni korral kaasneb tulbas esitatud aine kontsentratsiooni suurenemisel real esitatud aine kontsentratsiooni vähenemine. Ühikud ( $\mu\text{mol/L}$ , välja arvatud  $\text{mmol/L}$  ureale).

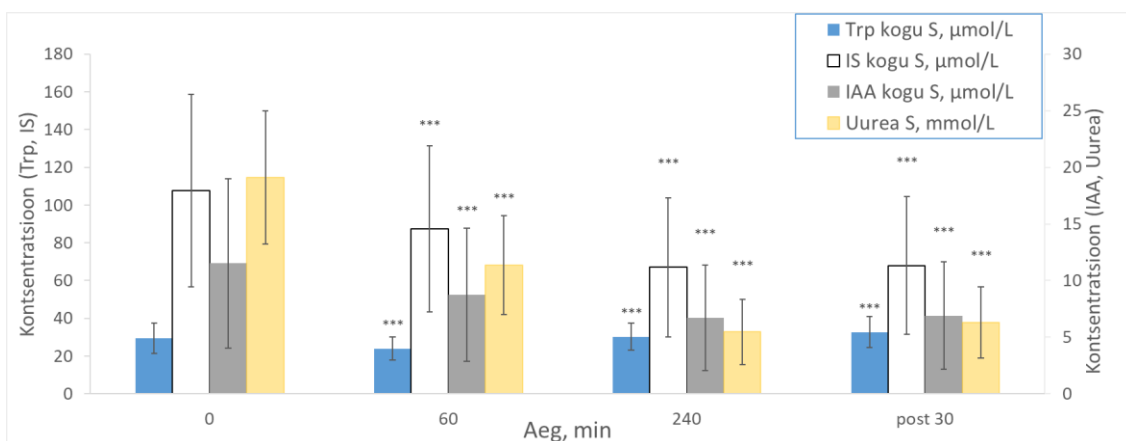
		<b>Trp (koguhulk)</b>	<b>IS (koguhulk)</b>	<b>IAA (koguhulk)</b>	<b>Urea</b>	<b>Trp (vaba)</b>	<b>IS (vaba)</b>
<b>IS (koguhulk)</b>	<b>r</b>	-0,35					
	<b>p</b>	< 0,001					
<b>IAA (koguhulk)</b>	<b>r</b>	-0,10	0,13				
	<b>p</b>	0,092	< 0,05				
<b>Urea</b>	<b>r</b>	-0,05	0,18	0,08			
	<b>p</b>	0,399	< 0,01	0,155			
<b>Trp (vaba)</b>	<b>r</b>	0,22	-0,07	0,05	0,18		
	<b>p</b>	< 0,001	0,241	0,351	< 0,01		
<b>IS (vaba)</b>	<b>r</b>	-0,48	0,82	0,11	0,15	0,25	
	<b>p</b>	< 0,001	< 0,001	0,057	< 0,01	< 0,001	
<b>IAA (vaba)</b>	<b>r</b>	-0,21	0,15	0,90	0,08	0,15	0,23
	<b>p</b>	< 0,001	< 0,05	< 0,001	0,149	< 0,01	< 0,001

Trp-i koguhulga ja IS-i kontsentratsioonid on omavahel negatiivses korrelatsioonis ehk kõrgema Trp-i tasemega patsientidel on madalam IS-i kontsentratsioon veres. IAA koguhulga ja Trp-i koguhulga kontsentratsioonide vahel seejuures statistiliselt oluline seos puudub. Kõige tugevam korrelatsioon on Trp-i metaboliitide koguhulga ja vaba osa kontsentratsiooni vahel, seda nii IS-i kui ka IAA puhul.

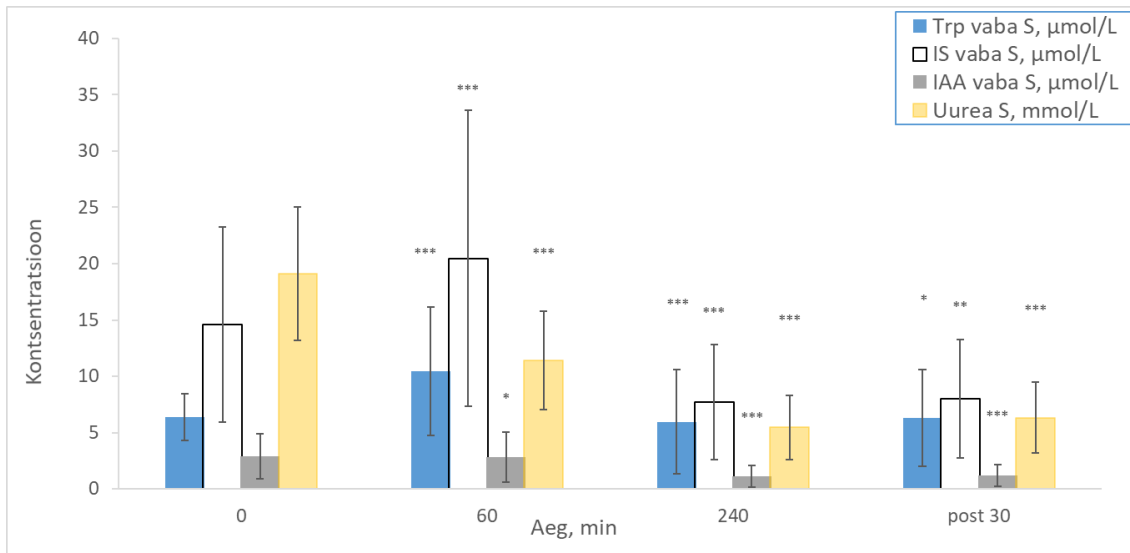
## 5.2 Trüptofaani ja trüptofaani metaboliitide tasemete ja valkudega seondumise muutused dialüüsiseansi käigus

Joonisel 4 on näidatud Trp-i, IS-i, IAA ja urea keskmised kontsentratsioonid vereseerumis (S) ning heitdialüsaadis (D) erinevatel ajapunktidel dialüüsiseansi käigus kõikide patsientide üleselt.

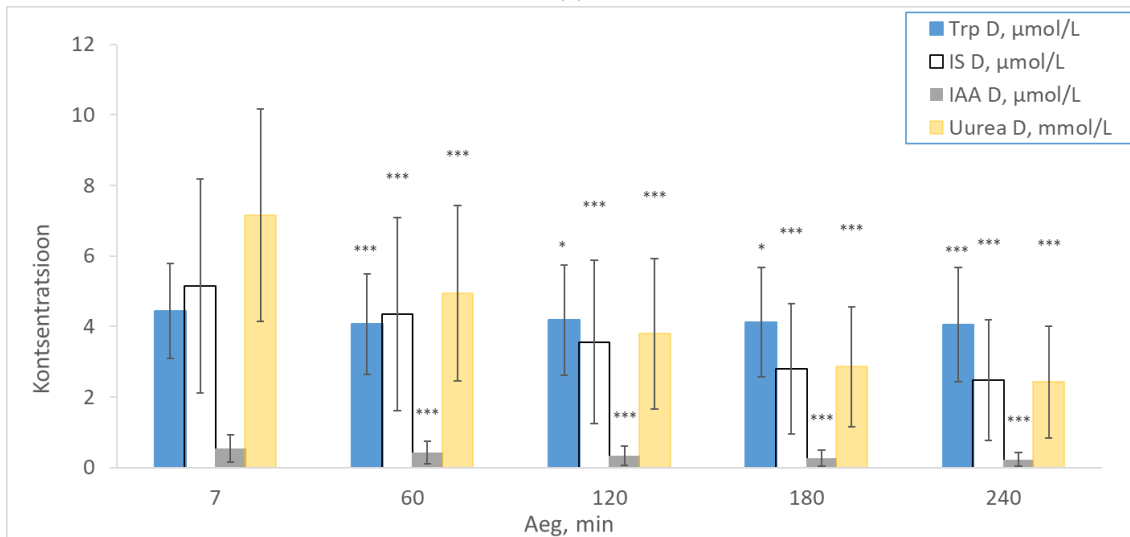
Jooniselt 4 a – b on näha, et dialüüsiseansi ajal väheneb IS-i, IAA ja urea kontsentratsioon veres, kuid Trp-i kontsentratsioon suureneb dialüüsiseansi lõpuks võrreldes dialüüsieelse kontsentratsiooniga ( $p < 0,001$ ). Jooniselt 4 b on näha, et seejuures suureneb dialüüsiseansi 60. minutiks IS-i ja Trp-i vaba osa kontsentratsioon veres võrreldes dialüüsieelse kontsentratsiooniga ( $p < 0,001$ ). Heitdialüsaati eemaldatud ureemiliste toksiinide kontsentratsioonid muutuvad dialüüsiseansi käigus sarnaste trendidega nagu ureemiliste toksiinide koguhulga kontsentratsioonid veres (vt Joonis 4 c). Trp-i kontsentratsioon heitdialüsaadis püsib seejuures võrdlemisi stabiilne, kuid ei suurene dialüüsiseansi lõpus nagu veres. Dialüüsieelsete ainete kontsentratsioonide suhtes normaliseeritud graafikud on esitatud Lisades 2 – 4, mis rõhutavad ainete kontsentratsiooni muutust dialüüsiseansi käigus [12].



(a)



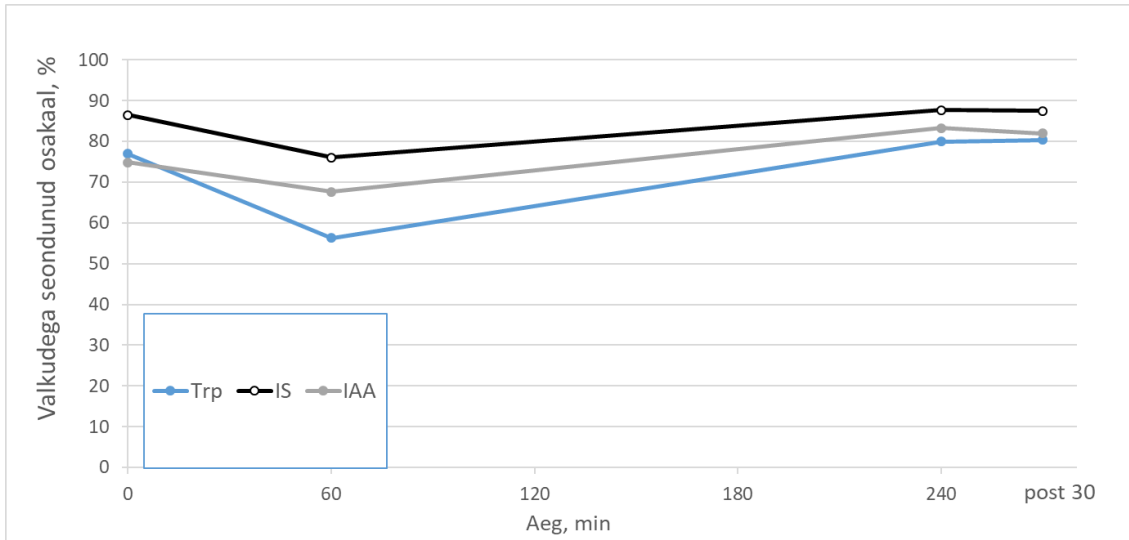
(b)



(c)

Joonis 4. Keskmine Trp-i, IS-i, IAA ( $\mu\text{mol/L}$ ), urea (mmol/L) kontsentratsioon ja standardhälve dialüüsiseansi erinevatel ajapunktidel kõikide patsientide üleselt: (a) ainete koguhulga järgi vereseerumis ( $n = 310$ ), (b) ainete vaba osa järgi vereseerumis ( $n = 310$ ), (c) ainete hulga järgi heitdialüsaadis ( $n = 257$ ). Statistilised erinevused võrreldes eelneva ajapunkti väärtusega on näidatud järgnevalt: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  vs. eelmine ajapunkti väärtus.

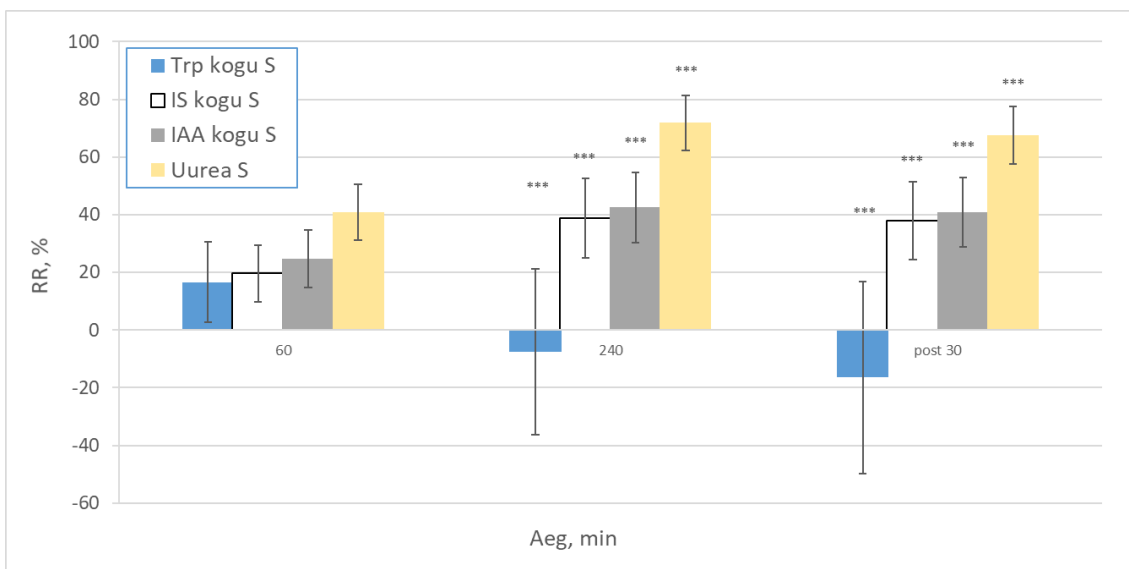
Keskmine IS-i, Trp-i ja IAA valkudega seondumise osakaal kõikide patsientide üleselt on näidatud Joonisel 5. Kõikide valkudega seonduvate ainete seondumine valkudega väheneb 60. minutil dialüüsieelse seondumise osakaaluga võrreldes ning dialüüsi lõpus on kõikide ainete valkudega seondumine osakaal dialüüsieelse väärtusega võrreldes suurenenud ( $p < 0,001$ ).



Joonis 5. IS-i, Trp-i ja IAA keskmine valkudega seondumise osakaal dialüüsiseansi käigus kõikide patsientide üleselt (n = 310). Kõik tulemused olid eelnevate ajapunktide väärtusega võrreldes statistiliselt olulised ( $p < 0,001$ ), välja arvatud 240 min vs. post 30 Trp-le ja IS-le.

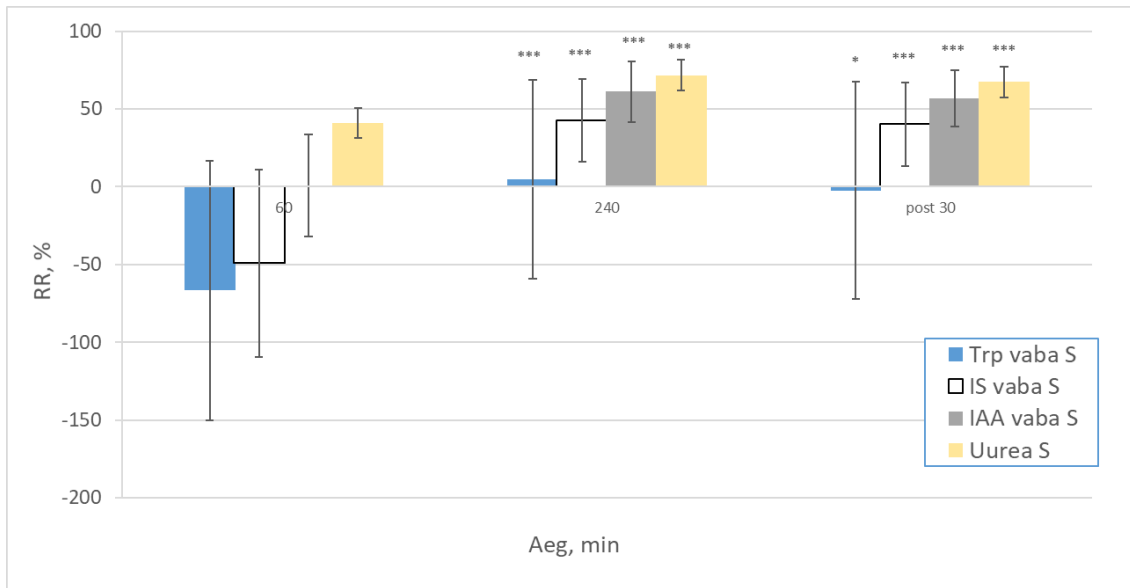
Ainete kontsentratsiooni järgi veres ning heitdialüsaadis arvutatud keskmine ainete kontsentratsiooni vähenemise määr dialüüsieelse kontsentratsiooni suhtes (RR) erinevatele ajapunktidele dialüüsiseansi käigus on näidatud Joonisel 6.

Kõige suurema varieeruvusega on Trp-i vaba osa ja koguhulga kontsentratsiooni järgi veres leitud RR väärtused (Joonis 6 a – b). Kuna Trp-i kontsentratsioon dialüüsiseansi käigus veres suureneb, siis on Trp-i koguhulga kontsentratsiooni järgi veres leitud RR väärtused negatiivsed ning erinevad ureemiliste toksiinide RR väärtustest (Joonis 6 a) [12].

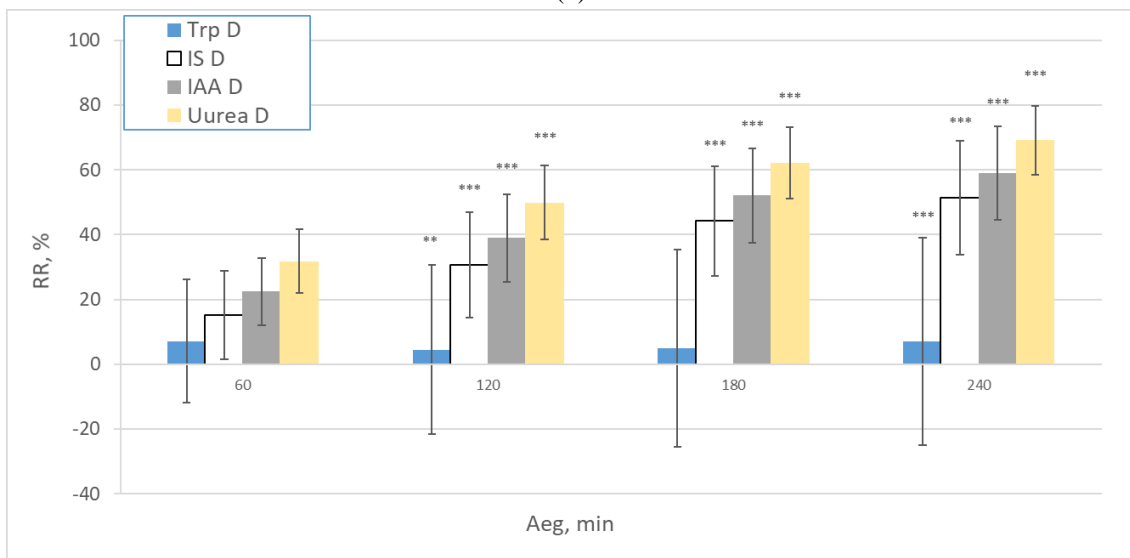


(a)





(b)



(c)

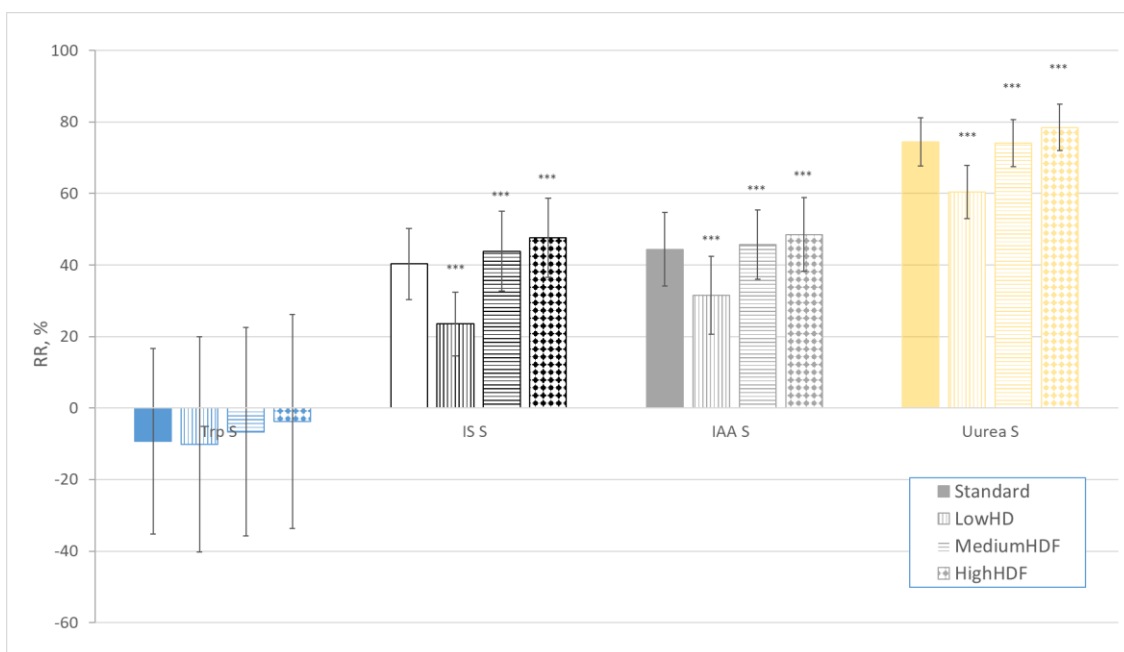
Joonis 6. Keskmine Trp-i, IS-i, IAA ja urea kontsentratsiooni vähenemise määr dialüüsieelse kontsentratsiooni suhtes (RR) ja standardhälve dialüüsiseansi erinevatel ajapunktidel kõikide patsientide üleselt: (a) ainete koguhulga järgi vereseerumis (n = 309), (b) ainete vaba osa järgi vereseerumis (n = 309), (c) ainete hulga järgi heitdialüsaadis (n = 244). Statistilised erinevused võrreldes eelneva ajapunkti väärtusega on näidatud järgnevalt: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  vs. eelmine ajapunkti väärtus.

Valkudega mitteseonduva urea RR väärtused on võrreldes IS-i ja IAA RR väärtustega tunduvalt suuremad. Trp-i ja IS-i vaba osa järgi leitud RR väärtused on 60. minutil negatiivsed vaba osa kontsentratsiooni suurenemise tõttu (Joonis 6 b). 30 minutit pärast dialüüsi lõppu võetud vereproovide järgi arvatud RR väärtused on madalamad võrreldes dialüüsi lõpus 240. minutil võetud proovide põhjal leitud RR väärtustega ( $p < 0,001$  ja  $p < 0,05$  Trp-le), mis väljendab tagasilöögi efekti [12].

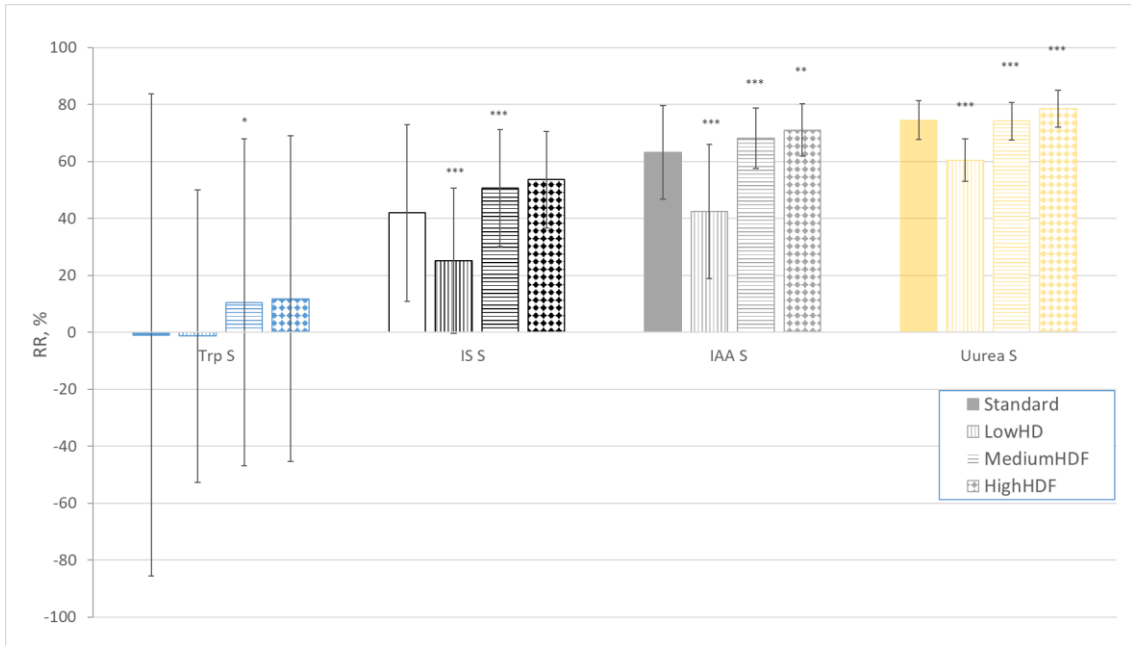
### 5.3 Dialüüsravi seadistuste ja modaliteedi mõju trüptofaani ja ureemiliste toksiinide eemaldamisele

Dialüüsravi modaliteetide ja seadistuse mõju Trp-i ja ureemiliste toksiinide IS, IAA ning urea eemaldamisele keskmiste RR väärtuste järgi 240. minutil ning dialüüsiseansi ajal eemaldatud ainete koguhulga (TRS) järgi modaliteetide ja dialüüsravi seadistuse põhised on näidatud Joonisel 7 [12].

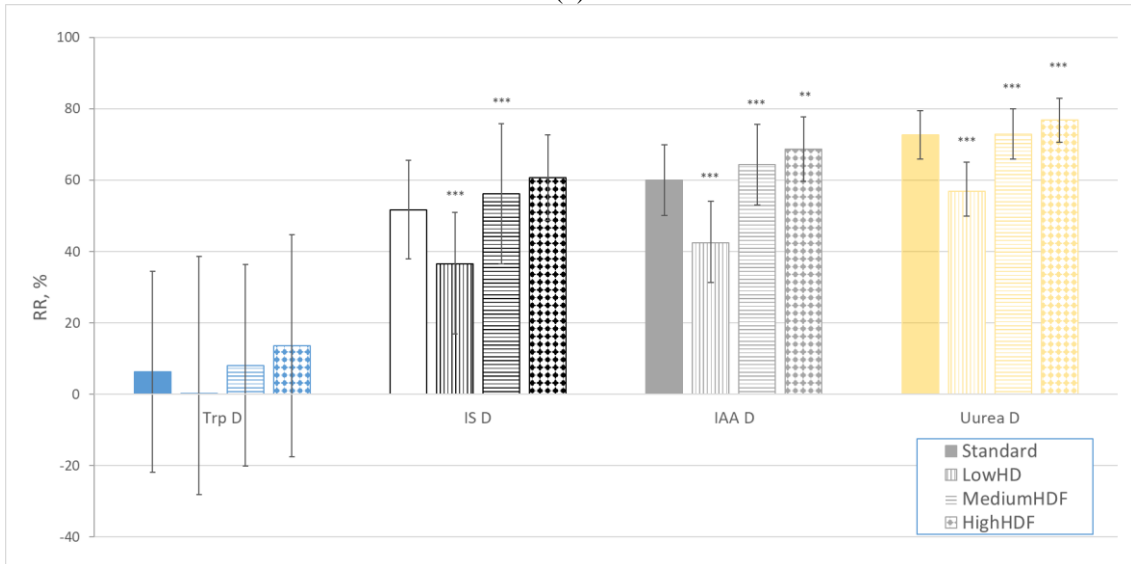
RR ja TRS väärtused IS-i, IAA ning urea jaoks on erinevate modaliteetide ja raviseadistuste jaoks samasuguse trendiga. Keskmised RR ja TRS väärtused on tavapärase hemodialüüsi puhul statistiliselt olulisemalt väiksemad võrrelduna teiste modaliteetide ja raviseadistusega ( $p < 0,001$ ). Kõige enam erinesid modaliteetide vahel TRS väärtused Trp-i jaoks, mille puhul “HighHDF” eemaldas 80% enam Trp-i kui “LowHD” (Joonis 7) [12].



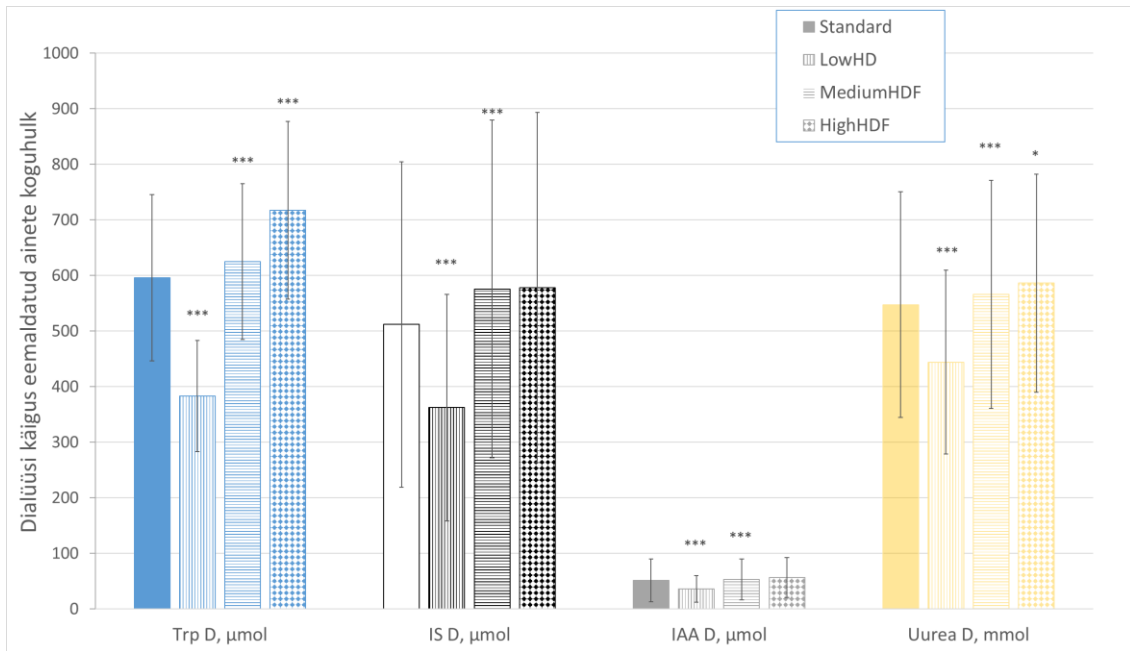
(a)



(b)



(c)



(d)

Joonis 7. Keskmised RR väärtused dialüüsideansi lõpus ning keskmine eemaldatud Trp-i, IS-i, IAA (µmol) ja urea koguhulk (mmol) raviseadistuse ja modaliteedi põhiselt standardhälvetega: (a) RR väärtused ainete koguhulga järgi vereseerumis (n = 77), (b) RR väärtused ainete vaba osa järgi vereseerumis (n = 77), (c) RR väärtused ainete hulga järgi heitdialüsaadis (n = 53), (d) TRS väärtused tanki kogutud heitdialüsaadi järgi (n = 74). \*\*\* p < 0,001; \*\* p < 0,01; \* p < 0,05 vs. eelmine andmepunkt.

## 6 Arutelu

Käesolevast tööst selgus, et eri dialüüsikeskuste patsientide keskmised dialüüsieelsed IS-i, urea ja Trp tasemed veres olid dialüüsikeskuste vahel erinevad. Kõige varieeruvam oli vaba Trp tase ning kõige sarnasem oli IAA tase veres, mis ei erinenud dialüüsikeskuste vahel. Ureemiliste toksiinide kontsentratsioonid olid seejuures kooskõlas eelnevates uuringutes esitatud kontsentratsioonidega [12][30][31].

Trp-i koguhulga kontsentratsioon veres oli praeguse töö andmete järgi kõikide patsientide üleselt  $29,3 \pm 8,0 \mu\text{mol/L}$ , mis on ligilähedane varasemalt dialüüsipatsientidel näidatuga [12][61][104]. Madalad Trp tasemed olid varasemate uuringute alusel omased ka hemodiaalüüsi patsientidele, kes tarbisid soovituslikust suurema valgusisaldusega dieeti ning täiendavalt toidulisandeid [52][61][105]. Ometi aitab aminohapete koguse suurendamine dieedis kompenseerida hemodialüüsiravi saavatel patsientidel suurenenud katabolismist tingitud komplikatsioone ja tõsta transportervalgu albumiini ning enamike aminohapete hulka veres [54][55][105].

Sellest võib järeldada, et piisava aminohapete sisaldusega dieedi korral on madal Trp-i tase veres põhjustatud teistest teguritest. Kroonilise neeruhaigusega kaasnevad enamasti põletikulised kaasuvad haigused, mille tõttu suureneb veres immuunvastust vahendavate proinflammatoorsete tsütokiinide IL-6, TNF- $\alpha$ , interferoonide jt tase [3][43][104]. Proinflammatoorsed tsütokiinid suurendavad aga ensüümi indoolamiin-2,3-dioksügenaasi katalüütilist aktiivsust, mis reguleerib Trp-i lagundamise kiirust künurenriini metabolismirajas [106]. Seejuures on näidatud, et indoolamiin-2,3-dioksügenaasi aktiivsuse suurenemine ja Trp-i taseme vähenemine veres on sõltuvuses KNH staadiumist ja põletikku vahendavate tsütokiinide kontsentratsioonist veres [104][107].

Proinflammatoorsete tsütokiinide teket põhjustavad ühe osana mikrofloora poolse aminohapete metabolismi käigus tekivad ureemilised toksiinid, nende hulgas ka Trp-i metaboliidid IS ja IAA [43][64]. Ureemilised toksiinid kahjustavad ühtlasi ka soolestiku epiteelirakke, mille tõttu suureneb vereringesse jõudvate bakteriaalsete endotoksiinide hulk, mis samuti suurendab proinflammatoorsete tsütokiinide teket ja üldist põletikku [43][108].

Seedimisel tekkivate ureemiliste toksiinide hulk sõltub aga hemodialüüsi patsientidel eelkõige dieedist ning mikrobioomist [38][108][109].

Teise ensüümi trüprofaan-2,3-dioksügenaas aktiivsust, mis Trp-i lagundamise kiirust künurenriini metabolismirajas reguleerib, põletik ei mõjuta ning selle ensüümi aktiivsus sõltub steroidhormoonide ja vaba Trp-i kontsentratsioonist [107][110]. Praeguse töö järgi hinnatuna oli dialüüsieelselt hemodialüüsi patsientidel Trp-st  $23 \pm 8\%$  veres vabana, mis on rohkem kui tervetel inimestel (10-20%) [12][54][61]. Vaba Trp-i osakaal sõltub aga albumiini kontsentratsioonist ning albumiiniga seondumisel konkureerivatest ühenditest veres. Nende hulgas vabadest rasvhapetest ja valkudega seonduvatest ureemilistest toksiinidest, mille kogust mõjutab dieet ning mikrobioom [34][35][110].

Käesoleva töö Trp-i ja Trp-i metaboliitide vaheliste seoste analüüsi tulemused näitavad, et suurenenud IS-i kontsentratsiooni korral on patsientide Trp-i tase veres madalam ning vastupidi, ( $r = -0,35$ ;  $p < 0,001$ ) ja ( $r = -0,48$ ;  $p < 0,001$ ) vastavalt IS-i koguhulga ja vaba osa kontsentratsiooni järgi. IAA kogukontsentratsiooni ja Trp-i kontsentratsiooni vahel statistiliselt olulist seost ei leitud erinevalt IAA vaba osa kontsentratsiooni ja Trp-i koguhulga kontsentratsiooni vahel ( $r = -0,21$ ;  $p < 0,001$ ). Seejuures on hemodialüüsravi saavate patsientide IAA tase tervete inimestega võrreldes keskmiselt 4 korda kõrgem, kuid IS-i puhul üle 40 korra kõrgem [31]. Tugevamat negatiivset korrelatsiooni ureemiliste toksiinide vaba osa ja Trp-i koguhulga vahel võib selgitada sellega, et ureemiliste toksiinide toksilisus ja põletikku tekitav toime tuleneb ainult valkudega mitteseonduvad vaba osa kontsentratsioonist veres [76]. Eelnevat arvesse võttes, võib IS-i, IAA ja Trp-i vaheline negatiivne korrelatsioon väljendada suurenenud Trp-i lagundamise kiirust organismis.

Varasemalt erinevate töögruppide poolt hinnatud ureemiliste toksiinide kontsentratsioonid veres on varieeruvad, tulenedes kasutatud meetodikast, uuritud patsientide valimist, nende geneetilisest eripärast, mikrobioomist, toitumisharjumustest ning ravistandarditest [30]. Kuigi käesoleva uurimuse raames patsientide dieeti ja mikrobioomi ei uuritud, siis eeldatavasti olid patsientidel kultuurist lähtuvalt erinevad toitumisharjumused ning mikrobioom. See võib olla põhjuseks patsientide keskmiste ureemiliste toksiinide ja Trp-i kontsentratsioonide mittedüstemaatilises erinevuses dialüüsikeskuste vahel [12].

Arvestades, et dialüüsi käigus eemaldatud ainete hulka mõjutab dialüüsieelne ureemiliste toksiinide kontsentratsioon ning valkudega seondunud ainete puhul vaba hulk veres [76], siis tuleb hemodialüüsravi modaalsuste efektiivsuse hindamisel kasutada heterogeenset valimit, mis hõlmab geneetiliselt, geograafiliselt ja toitumisharjumuste poolest erinevaid katsealuseid [12].

Käesoleva töö tulemused näitavad, et dialüüsiseansi ajal vähenevad keskmised IS-i, IAA ja uurea kontsentratsioonid veres, kuid Trp-i kontsentratsioon veres suureneb dialüüsi lõpuks dialüüsieelse kontsentratsiooniga võrreldes [12]. See on kooskõlas varasemates uuringutes näidatuga, kus on kirjeldatud eraldiseisvalt IAA, IS-i, uurea ja Trp-i kontsentratsiooni muutusi veres dialüüsi vältel [5][6][32][61].

Trp-i kontsentratsiooni suurenemise kohta dialüüsiseansi käigus on aga vähe teada [61]. Veres leiduva Trp-i kontsentratsiooni homöostaatilne reguleerimine toimub kudedele kättesaadava vaba Trp-i koguse järgi [110]. Post et al näitasid hiljuti 40 hollandlasest hemodialüüsi patsiendiga läbiviidud uuringus, et ühe dialüüsiseansi käigus eemaldatakse patsientide kehast Trp-i kogus, mis on üle 20 korra suurem dialüüsieelsest Trp-i kogusest veres, moodustades ligi 10% päevasest dieediga omastatavast Trp-i kogusest. Sellest sõltumata tõusis 82% patsientidest dialüüsiseansi lõpuks Trp-i kontsentratsioon veres 16% dialüüsieelse väärtusega võrreldes. Töö autorid oletasid, et Trp-i kontsentratsiooni tõus võib tuleneda lihaste katabolismist või seedetraktist vabanenud Trp-st ning väitsid, et sellel efektil on kaitsev mõju. Viimane põhines tähelepanekul, et patsientidel, kelle Trp-i tase langes dialüüsi lõpuks, oli suurem suremusrisk [61]. Samasugust Trp-i kontsentratsiooni suurenemist dialüüsi lõpuks kirjeldasid hiljuti ka väiksema patsientide valimiga Hendriks et al, kusjuures kõikide teiste aminohapete kontsentratsioon veres vähenes dialüüsi lõpuks [52][12].

Käesoleva töö autor on arvamusel, et tõenäoliselt on Trp-i kontsentratsiooni suurenemine tingitud aminohapete vajaliku kontsentratsiooni tagamisest veres homöostaatilise regulatsiooni kaudu ja tegu pole kaitsva efektiga. See võib tuleneda Trp-i ja teiste aminohapete eemaldamisest ravi käigus või dialüüsiseansi protsessist endast, mille tõttu muutub aminohapete genereerimine, metabolism või transport kehas [12] [39][44][48]. Trp-i kontsentratsiooni muutuse erinevus teiste aminohapetega võrreldes võib tuleneda albumiiniga seondumisest.

Seejuures võivad patsiendid, kelle Trp-i tase veres dialüüsi lõpuks suureneb, olla tervemad, sest suudavad homöostaatiliselt Trp-i kogust veres efektiivsemalt reguleerida või seondub neil patsientidel Trp suuremal määral albumiiniga suurema albumiini kontsentratsiooni tõttu [12]. Töö tulemused kinnitavad suurema ja heterogeensema valimiga Post et al poolt täheldatud, et dialüüsiseansi vältel suureneb Trp-i kontsentratsioon veres samaaegselt suure Trp-i hulga eemaldamisega heitdialüsaati. Ühtlasi näitab käesolev töö, et eemaldatud Trp-i hulk sõltub kasutatavast modaliteedist [12].

Kuna dialüüsiseansi vältel Trp-i kontsentratsioon veres suureneb, siis on RR väärtuste kaudu väljendatav suhteline Trp-i eemaldamine verest algkontsentratsiooni osas negatiivne. Trp-i kontsentratsioon heitdialüsaadis püsib dialüüsiseansi vältel seejuures võrdlemisi stabiilne, kuid ei suurene dialüüsi lõpus. Sellest tulenevalt ei ole vere- ja heitdialüsaadi proovide kontsentratsiooni muutuste ega RR järgi võimalik hinnata dialüüsi käigus eemaldatud Trp-i osakaalu, mida on võimalik teha IS-i, IAA ja urea jaoks [12].

Eelnevat arvesse võttes suureneb heitdialüsaadis Trp-i suhteline kogus Trp-i metaboliitidega võrreldes. Kuna heitdialüsaati eemaldatavate valkudega seonduvate ühendite fluorestsents ergastuslainepikkusel  $\lambda = 280$  nm ja emissioon lainepikkusel  $\lambda = 350$  nm on peamiselt seotud Trp-i ja Trp-i metaboliitidega [10], suureneb seetõttu Trp-i põhjustatud heitdialüsaadi fluorestsentsi osakaal heitdialüsaadi valkudega seonduvate ühendite kogufluorestsentsist neil lainepikkustel. See teadmine aitab paremini interpreteerida optiliste hemodialüüsi kvaliteeti monitoorivate sensorite poolt neil lainepikkustel mõõdetud heitdialüsaadi fluorestsentssignaali muutust, mille kaudu on võimalik hinnatakse valkudega seonduvate molekulide eemaldamist dialüüsiravi käigus [8][9].

Magistritöö käigus modaliteetide ja raviseadistuste võrdlemisel selgus, et kõik raviseadistused ja modaliteedid eemaldavad ureemilisi toksiine ja Trp-i samade trendidega, kuid erineva efektiivsusega. Keskmised RR ja TRS väärtused olid tavapärase hemodialüüsi puhul teiste modaliteetide ja raviseadistusega võrrelduna statistiliselt väiksemad ( $p < 0,001$ ). Kõige enam erinesid modaliteetide vahel eemaldatud ainete koguhulka väljendavad TRS väärtused Trp-i jaoks, mille puhul "HighHDF" eemaldas 80% enam Trp-i kui "LowHD".



Kõige suurema varieeruvusega olid Trp-i vaba osa ja koguhulga kontsentratsiooni järgi veres leitud RR väärtused, mis ei väljenda dialüüsi käigus eemaldatud Trp-i koguhulka, vaid pigem patsientide eripärasid [12].

Kuigi käesolevas töös patsientide dieeti ei uuritud, siis eeldusel, et patsientide poolt tarbitav Trp-i kogus oli sarnane Post et al poolt näidatuga [61], võib "HighHDF" dialüüsiseanss eemaldada 16% päevas tarbitavast Trp-st [12]. Lisaks Trp-i eemaldamisele tuleks dialüüsiseansi negatiivse mõju hindamisel arvestada ka teiste aminohapete eemaldamisega. Hendriks et al näitasid hiljuti, et ühe hemodialüüsi seansiga eemaldatakse patsiendi kehast  $11,95 \pm 69$  g aminohappeid, mille tõttu vähenes veres kõikide, välja arvatud Trp-i, aminohapete kontsentratsioon 20% võrra dialüüsi lõpuks [52].

Seejuures kaasneb HDF modaliteediga dialüüsravil suurem aminohapete kadu, kui HD modaliteediga dialüüsravil ning HDF modaliteedi kasutamisel suureneb aminohapete kadu asendusvedeliku ruumala suurendamisel [45]. Trp-i ja Trp-i metaboliitide eemaldamise seisukohast on seetõttu patsiendile vähekoormavam "MediumHDF" ravi rakendamine, mis eemaldab "HighHDF" dialüüsraviga sarnases koguses Trp-i metaboliite, kuid vähem Trp-i. Tavapärase minimaalsete seadistusega hemodialüüsravi eemaldab aga HDF modaliteetidega võrreldes tunduvalt vähem ureemilisi toksine [12].

Kuna valkudega seonduvatest ühenditest eemaldatakse hemodialüüsi käigus ainult vaba osa [33][34][35], siis uuriti töö käigus ka IS-i, IAA ning Trp-i valkudega seondumise osakaalu muutust dialüüsiseansi vältel. Dialüüsieelselt olid patsientide keskmised valkudega seonduvad ühendite osakaalud järgnevad: Trp  $77 \pm 8\%$ , IS  $87 \pm 5\%$ , IAA  $75 \pm 6\%$ , mis on kooskõlas varasemalt hemodialüüsravi saavatel patsientidel hinnatuga [111]. Dialüüsiseansi lõppedes oli kõikide valkudega seonduvad ühendite valkude seondumine vähesel määral suurenenud ( $p < 0,001$ ). Sellele vastupidiselt vähenes dialüüsiseansi 60 minutiks Trp-i, IS-i ja IAA valkudega seonduvad osakaal ( $p < 0,001$ ). Seda kajastab ka IS-i ja Trp-i vaba osa kontsentratsioon tõus dialüüsieelse kontsentratsiooniga võrreldes ( $p < 0,001$ )[12].

Valkudega seonduvate ureemiliste toksiinide valkudega seondumise muutust on dialüüsiseansi ajal vähe uuritud, ning pigem on keskendunud valkudega seonduvate ühendite vabastamisele albumiini küljest [34][35][76].

2015. aastal Deltombe poolt 10 patsiendiga läbiviidud uuringu tulemused näitasid, et dialüüsiseansi lõpuks suureneb valkudega seonduvate ühendite valkudega seotuse osakaal, kuigi dialüüsiseansi 60. minutil ei täheldatud valkudega seonduvate statistiliselt olulisi muutusi [76].

Käesolevas töös nähtud Trp-i, IS-i ja IAA valkudega seonduvate vähenemine 60. minutil võib tuleneda ühe võimaliku põhjusena hemodialüüsil vere koaguleerimise takistamiseks patsientidele vereringesse infuseeritava hepariini kõrvaltoimest, mille tõttu suureneb veres vabade rasvhapete kontsentratsioon [12]. See tuleneb hepariini poolt põhjustatud lipaaside vabanemisest vereringesse, mis ensümaatilisel viisil veres olevaid lipoproteiine ja triglütseriide vabadeks rasvhapete lagundavad [112][113].

Kuna IS, IAA ja Trp ning vabad rasvhapped seonduvad kõik albumiiniga peamiselt sama Sudlow II seonduvate kaudu, siis põhjustab vabade rasvhapete kontsentratsiooni tõus veres täiendavat konkurentsi valkudega seonduvate ühendite seonduvate albumiiniga. See põhjustab aga albumiiniga seonduvate ureemiliste toksiinide osakaalu vähenemist, mille tõttu tõuseb valkudega seonduvate ureemiliste toksiinide vaba osa kontsentratsioon veres [12][35][114][115][116].

Seejuures on lipaaside mõju lipoproteiinide ja triglütseriidide lagundamisele kõige suurem 30 minutil pärast hepariini manustamist ja väheneb tunduvalt 120 minutiks, saavutades stabiilse aktiivsuse dialüüsi lõpuni [112][113]. Lipaaside aktiivsusega suurenemisega väheneb vastupidiselt triglütseriidide kontsentratsioon veres dialüüsi esimeses pooles, kuid suureneb dialüüsiseansi lõpus dialüüsieelsele tasemega võrreldes, mis väljendab vabade rasvhapete kontsentratsiooni suurenemise vähenemist dialüüsi lõpus [117]. See võib selgitada 60 minuti järel täheldatud valkudega seonduvate osakaalu taastumist dialüüsiseansi eelsele tasemele dialüüsiseansi lõpuks.

Eelpool välja toodule tuginedes võib hepariinil olla suur mõju valkudega seonduvate ühendite eemaldamisele dialüüsiseansi käigus. Hepariinist tingitud võimaliku mõju kontrollimiseks oleks vaja aga täiendavalt hinnata vabade rasvhapete, triglütseriidide ja lipoproteiinide hulga muutust dialüüsiseansi käigus, arvestades albumiini ja albumiiniga konkureerivalt seonduvate ühendite kontsentratsiooniga veres. Samuti tuleks hinnata patsientide dialüüsiseansi aegse dieedi mõju, mis mõjutab verre eralduvate ja seeläbi heitdialüüsiaati eemaldatud Trp-i ja rasvade koguhulka [52].

Eelneva arvesse võtmine aitaks eristada patsientidest tulenevat mõju ja hinnata täpsemalt modaliteetide ja raviseadistuste mõju valkudega seonduvate ainete eemaldamisele.

## 7 Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö eesmärk oli hinnata dialüüsravi mõju Trp-i ja Trp-i metaboliitide eemaldamisele kroonilise neerupuudulikkusega patsientide ravil dialüüsravi seadistuste ja modaliteedi põhisel. Töö hüpotees oli, et Trp-i ja Trp-i metaboliitide eemaldamise efektiivsus ja tasemete muutus dialüüsravi käigus sõltub dialüüsravi seadistustest.

Töö käigus määrati HPLC abil Trp-i ja Trp-i metaboliitide kontsentratsioon 78 patsiendilt dialüüsiseansside ajal kogutud üle kolme tuhandes erinevas heitdialüsaadi- ja vereproovis. Saadud kontsentratsioonide põhjal leiti Trp-i, IS-i, IAA ja uurea suhteline eemaldamise määr dialüüsieelse kontsentratsiooni suhtes dialüüsiseansi erinevatel ajapunktidel, Trp-i, IS-i ja IAA valkudega seondumise määr dialüüsiseansi erinevatel ajapunktidel ning dialüüsiseansi lõpuks eemaldatud ainete koguhulk.

Analüüsides dialüüsieelseid ureemiliste toksiinide ja Trp-i kontsentratsiooni selgus, et erinevates dialüüsikeskustes on dialüüsieelselt patsientide keskmised Trp-i, IS-i ja uurea keskmised kontsentratsioonid veres mittesüstemaatiliselt erinevad, IAA kontsentratsioonid eri keskuste patsientide vahel ei erinenud. Kõikide patsientide ülene keskmine dialüüsieelne trüptofaani kontsentratsioon veres oli  $29,3 \pm 8,0 \mu\text{mol/L}$ . Trp-i koguhulga kontsentratsiooni ning IS-i ja IAA vaba osa kontsentratsiooni vahel leiti statistiliste oluline seos, vastavalt ( $r = -0,48$ ;  $p < 0,001$ ) ja ( $r = -0,21$ ;  $p < 0,001$ ). Seejuures võib Trp-i, IS-i ja IAA vaheline negatiivne korrelatsioon väljendada suurenenud Trp-i lagundamise kiirust organismis, mis on tingitud põletikust ja/või suurenenud Trp-i vaba osa kontsentratsioonist veres.

Magistritööst selgus, et dialüüsiseansi ajal vähenevad keskmised uurea IS-i ja IAA koguhulga kontsentratsioonid veres, mida väljendab ainete suhtelise vähenemise määr dialüüsieelse kontsentratsiooniga võrreldes (72%, 39%, 43%), kuid Trp-i kontsentratsioon veres suureneb dialüüsi lõpuks mille tõttu on keskmise Trp-i koguhulga järgi leitud RR väärtus dialüüsi lõpus negatiivne (-8%), hoolimata suurest Trp-i eemaldamisest heitdialüsaati ( $p < 0,001$ ). Trp-i kontsentratsioon heitdialüsaadis püsib dialüüsiseansi vältel seejuures võrdlemisi stabiilne, kuid ei suurene dialüüsi lõpus.

Sellest tulenevalt ei ole vere- ja heitdialüsaadi proovide kontsentratsiooni muutuste ega RR järgi võimalik hinnata dialüüsi käigus eemaldatud Trp-i koguhulka. Samuti suureneb seetõttu heitdialüsaadis Trp-i põhjustatud fluorestsentsi osakaal võrdluses IAA ja IS-ga. Trp-i kontsentratsiooni suurenemine veres tuleneb tõenäoliselt homöostaatilise regulatsiooni kaudu vajaliku aminohapete koguse tagamisest veres, näiteks suurenenud endogeense Trp-i vabastamise kaudu organismis, mida põhjustab verest aminohapete heitdialüsaati eemaldamine.

Raviseadistuste ja modaliteetide võrdluses ilmnes, et kõik raviseadistused ja modaliteetid eemaldavad ureemilisi toksine ja Trp-i samade trendidega, kuid erineva efektiivsusega. Keskmised RR-i ja TRS-i väärtused olid tavapärase hemodialüüsi puhul teiste modaliteetide ja raviseadistusega võrrelduna statistiliselt olulisemalt väiksemad ( $p < 0,001$ ). Kõige enam erinesid modaliteetide vahel eemaldatud ainete koguhulka väljendavad TRS väärtused Trp-i jaoks, mille puhul "HighHDF" eemaldas 80% enam Trp-i kui "LowHD" ( $p < 0,001$ ). "HighHDF" dialüüsravi ühe dialüüsiseansi käigus eemaldatud Trp-i hulk oli ~ 16% eeldatavast päevas tarbitavast Trp-ist. Trp-i ja Trp-i metaboliitide eemaldamise seisukohast on seetõttu patsiendile vähekoormavam "MediumHDF" ravi rakendamine, mis eemaldab "HighHDF" dialüüsiraviga sarnases koguses Trp-i metaboliite, kuid vähem Trp-i. Tavapärast minimaalsete seadistusega hemodialüüsiravi rakendades eemaldatakse aga HDF modaliteetidega võrreldes tunduvalt vähem ureemilisi toksine.

Dialüüsieelselt olid patsientide keskmised valkudega seondunud ühendite osakaalud järgnevad: Trp  $77 \pm 8\%$ , IS  $87 \pm 5\%$ , IAA  $75 \pm 6\%$ . Dialüüsiseansi 60. minutil oli valkudega seondumise osakaal Trp-i, IS-i ja IAA puhul oluliselt vähenenud ( $p < 0,001$ ), see on kooskõlas Trp-i, IS-i vaba osa kontsentratsiooni tõusuga 60. minutil. Sama väljendavad ka negatiivsed Trp-i ja IS-i vaba osa negatiivsed RR väärtused 60. minutil. Dialüüsiseansi lõpuks suureneb valkudega seondunud Trp-i, IS-i ja IAA valkudega seondumise osakaal dialüüsieelse väärtusega võrreldes ( $p < 0,001$ ). Tõenäoliselt on see tingitud hepariini manustamisest dialüüsi alguses, mille tõttu suureneb vabade rasvhapete hulk vereringes, mis konkureerivalt albumiiniga seonduvad. Hepariinist tulenev mõju on seejuures dialüüsieelselt kõige suurem ja väheneb dialüüsi käigus.

Kokkuvõtlikult osutus magistritöös püstitud hüpotees tõseks ja dialüüsravi raviseadistustel ning modaliteetidel on arvestatav mõju Trp-i, IS-i, IAA ja urea eemaldamisele verest dialüüsravi käigus.

## Kasutatud kirjandus

- [1] Bikbov, B., Perico, N., Remuzzi, G., „Disparities in Chronic Kidney Disease Prevalence among Males and Females in 195 Countries: Analysis of the Global Burden of Disease 2016 Study“, — *Nephron*, 2018, 139, (4), 313–318, doi: 10.1159/000489897.
- [2] Liyanage, T., Ninomiya, T., Jha, V., Neal, B., Patrice, H. M., Okpechi, I., Zhao, M. H., Lv, J., Garg, A. X., Knight, J., ... Perkovic, V., „Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: A systematic review“, — *The Lancet*, 2015, 385, (9981), 1975–82, doi: 10.1016/S0140-6736(14)61601-9.
- [3] Dukkipati, R., Kopple, J. D., „Causes and Prevention of Protein-Energy Wasting in Chronic Kidney Failure“, — *Seminars in Nephrology*, 2009, 29, (1), 39–49, doi: 10.1016/j.semnephrol.2008.10.006.
- [4] Daugirdas, J. T., Depner, T. A., Inrig, J., Mehrotra, R., Rocco, M. V., Suri, R. S., Weiner, D. E., Greer, N., Ishani, A., MacDonald, R., ... Brereton, L., „KDOQI Clinical Practice Guideline for Hemodialysis Adequacy: 2015 Update“, — *American Journal of Kidney Diseases*, 2015, 66, (5), 884–930, doi: 10.1053/j.ajkd.2015.07.015.
- [5] Eloot, S., Dhondt, A., Van Landschoot, M., Waterloos, M.-A., Vanholder, R., „Removal of water-soluble and protein-bound solutes with reversed mid-dilution versus post-dilution haemodiafiltration“, — *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2012, 27, (8), 3278–3283, doi: 10.1093/ndt/gfs060.
- [6] Morena, M., Creput, C., Bouzernidj, M., Rodriguez, A., Chalabi, L., Seigneux, B., Lauret, C., Bargnoux, A.-S., Dupuy, A.-M., Cristol, J.-P., „Randomised trial on clinical performances and biocompatibility of four high-flux hemodialyzers in two mode treatments: hemodialysis vs post dilution hemodiafiltration“, — *Scientific Reports*, 2019, 9, (1), 18265, doi: 10.1038/s41598-019-54404-7.
- [7] Vanholder, R., Glorieux, G., Eloot, S., „Once upon a time in dialysis: the last days of Kt/V?“, — *Kidney International*, 2015, 88, (3), 460–465, doi: 10.1038/ki.2015.155.

- [8] Pilt, K., Arund, J., Adoberg, A., Leis, L., Fridolin, I., Luman, M., „SuO012INTRADIALYTIC ON-LINE MULTICOMPONENT REDUCTION RATIO MONITORING IN SPENT DIALYSATE BY A NOVEL MINIATURIZED OPTICAL SENSOR“, — *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2019, 34, (Supplement\_1), doi: 10.1093/ndt/gfz102.SuO012.
- [9] „Challenge“. [WWW] <https://optofluidtech.com/#problem> (4. 01. 2020).
- [10] Arund, J., Luman, M., Uhlin, F., Tanner, R., Fridolin, I., „Is Fluorescence Valid to Monitor Removal of Protein Bound Uremic Solutes in Dialysis?“, — *PLOS ONE*, 2016, 11, (5), e0156541, doi: 10.1371/journal.pone.0156541.
- [11] „On-line Dialysis Sensor Phase2“, 2017. [WWW] <https://cordis.europa.eu/project/id/767572> (5. 05. 2020).
- [12] Paats, J., Adoberg, A., Arund, J., Dhondt, A., Fernström, A., Fridolin, I., Glorieux, G., Leis, L., Luman, M., Gonzalez-Parra, E., ... Arduan Ortiz, A., „Serum Levels and Removal by Haemodialysis and Haemodiafiltration of Tryptophan-Derived Uremic Toxins in ESKD Patients“, — *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21, (4), 1522, doi: 10.3390/ijms21041522.
- [13] Stanfield, C. L., *Principles of Human Physiology*, 5. tr. London: Pearson, 2013.
- [14] Eknoyan, G., Lameire, N., Eckardt, K.-U., Kasiske, B. L., Wheeler, D. C., Abboud, O. I., Adler, S., Agarwal, R., „Chapter 1: Definition and classification of CKD“, — *Kidney International Supplements*, 2013, 3, (1), 19–62, doi: 10.1038/kisup.2012.64.
- [15] Delanaye, P., Schaeffner, E., Ebert, N., Cavalier, E., Mariat, C., Krzesinski, J.-M., Moranne, O., „Normal reference values for glomerular filtration rate: what do we really know?“, — *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2012, 27, (7), 2664–2672, doi: 10.1093/ndt/gfs265.
- [16] Levey, A. S., Eckardt, K.-U., Dorman, N. M., Christiansen, S. L., Hoorn, E. J., Ingelfinger, J. R., Inker, L. A., Levin, A., Mehrotra, R., Palevsky, P. M., ... Winkelmayr, W. C., „Nomenclature for kidney function and disease: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference“, *Kidney International*, 2020, doi: 10.1016/j.kint.2020.02.010.
- [17] Webster, A. C., Nagler, E. V., Morton, R. L., Masson, P., „Chronic Kidney Disease“, — *The Lancet*, 2017, 389, (10075), 1238–1252, doi: 10.1016/S0140-6736(16)32064-5.



- [18] Almeras, C., Argilés, À., „PROGRESS IN UREMIC TOXIN RESEARCH: The General Picture of Uremia“, — *Seminars in Dialysis*, 2009, 22, (4), 329–333, doi: 10.1111/j.1525-139X.2009.00575.x.
- [19] Schiffrin, E. L., Lipman, M. L., Mann, J. F. E., „Chronic kidney disease: Effects on the cardiovascular system“, — *Circulation*, 2007, 116, (1), 85–97, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678342.
- [20] Abecassis, M., Bartlett, S. T., Collins, A. J., Davis, C. L., Delmonico, F. L., Friedewald, J. J., Hays, R., Howard, A., Jones, E., Leichtman, A. B., ... Gaston, R. S., „Kidney Transplantation as Primary Therapy for End-Stage Renal Disease: A National Kidney Foundation/Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF/KDOQI™) Conference“, — *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2008, 3, (2), 471–480, doi: 10.2215/CJN.05021107.
- [21] Jay, C. L., Dean, P. G., Helmick, R. A., Stegall, M. D., „Reassessing Preemptive Kidney Transplantation in the United States: Are We Making Progress?“, — *Transplantation*, 2016, 100, (5), 1120–1127, doi: 10.1097/TP.0000000000000944.
- [22] Azar, A., Canaud, B., „Hemodialysis System“, *Modelling and Control of Dialysis Systems*, 404, New York: Springer US, 2012, 99–166.
- [23] Santoro, D., Benedetto, F., Mondello, P., Spinelli, F., Ricciardi, C., Cernaro, V., Buemi, M., Pipito', N., Barilla', D., „Vascular access for hemodialysis: current perspectives“, — *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 2014, 7, 281, doi: 10.2147/IJNRD.S46643.
- [24] Ozmen, S., Kadiroglu, A. K., Ozmen, C. A., Danis, R., Sit, D., Akin, D., Yilmaz, M. E., „Does the direction of arterial needle in AV fistula cannulation affect dialysis adequacy?“, — *Clinical Nephrology*, 2008, 70, (3), 229–232, doi: 10.5414/cnp70229.
- [25] Kessler, M., Moureau, F., Nguyen, P., „Anticoagulation in Chronic Hemodialysis: Progress Toward an Optimal Approach“, — *Seminars in Dialysis*, 2015, 28, (5), 474–489, doi: 10.1111/sdi.12380.
- [26] Kotanko, P., Kuhlmann, M. K., Levin, N. W., „CHAPTER 89 - Hemodialysis: Principles and Techniques“, *Comprehensive Clinical Nephrology*, 4. tr, Philadelphia: Mosby, 2010, 1058.
- [27] Wolfson, M., „Management of Protein and Energy Intake in Dialysis Patients“, — *Journal of the American Society of Nephrology*, 1999, 10, (10), 2244–2247.

- [28] Tanaka, H., Sirich, T. L., Plummer, N. S., Weaver, D. S., Meyer, T. W., „An Enlarged Profile of Uremic Solutes“, — *PLOS ONE*, 2015, 10, (8), e0135657, doi: 10.1371/journal.pone.0135657.
- [29] Vanholder, R., Pletinck, A., Schepers, E., Glorieux, G., „Biochemical and Clinical Impact of Organic Uremic Retention Solutes: A Comprehensive Update“, — *Toxins*, 2018, 10, (1), 33, doi: 10.3390/toxins10010033.
- [30] Vanholder, R., De Smet, R., Glorieux, G., Argilés, A., Baurmeister, U., Brunet, P., Clark, W., Cohen, G., De Deyn, P. P., Deppisch, R., ... Zidek, W., „Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability“, — *Kidney International*, 2003, 63, (5), 1934–1943, doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x.
- [31] Durantou, F., Cohen, G., De Smet, R., Rodriguez, M., Jankowski, J., Vanholder, R., Argiles, A., „Normal and Pathologic Concentrations of Uremic Toxins“, — *Journal of the American Society of Nephrology*, 2012, 23, (7), 1258–1270, doi: 10.1681/ASN.2011121175.
- [32] Meert, N., Eloit, S., Schepers, E., Lemke, H.-D., Dhondt, A., Glorieux, G., Van Landschoot, M., Waterloos, M.-A., Vanholder, R., „Comparison of removal capacity of two consecutive generations of high-flux dialysers during different treatment modalities“, — *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2011, 26, (8), 2624–2630, doi: 10.1093/ndt/gfq803.
- [33] Florens, N., Yi, D., Juillard, L., Soulage, C. O., „Using binding competitors of albumin to promote the removal of protein-bound uremic toxins in hemodialysis: Hope or pipe dream?“, — *Biochimie*, 2018, 144, 1–8, doi: 10.1016/j.biochi.2017.09.018.
- [34] Madero, M., Cano, K. B., Campos, I., Tao, X., Maheshwari, V., Brown, J., Cornejo, B., Handelman, G., Thijssen, S., Kotanko, P., „Removal of Protein-Bound Uremic Toxins during Hemodialysis Using a Binding Competitor“, — *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2019, 14, (3), 394–402, doi: 10.2215/CJN.05240418.
- [35] Tao, X., Thijssen, S., Kotanko, P., Ho, C.-H., Henrie, M., Stroup, E., Handelman, G., „Improved dialytic removal of protein-bound uraemic toxins with use of albumin binding competitors: an in vitro human whole blood study“, — *Scientific Reports*, 2016, 6, (1), 23389, doi: 10.1038/srep23389.

- [36] Wu, G., „Amino acids: metabolism, functions, and nutrition“, — *Amino Acids*, 2009, 37, (1), 1–17, doi: 10.1007/s00726-009-0269-0.
- [37] Weiner, I. D., Mitch, W. E., Sands, J. M., „Urea and Ammonia Metabolism and the Control of Renal Nitrogen Excretion“, — *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 2015, 10, (8), 1444–1458, doi: 10.2215/CJN.10311013.
- [38] Gryp, T., Huys, R. B. G., Joossens, M., Van Biesen, W., Glorieux, G., Vaneechoutte, M., „Isolation and Quantification of Uremic Toxin Precursor-Generating Gut Bacteria in Chronic Kidney Disease Patients“, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, (6). 2020, doi: 10.3390/ijms21061986.
- [39] Vanholder, R., Schepers, E., Pletinck, A., Nagler, E. V, Glorieux, G., „The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: a systematic review“, — *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 2014, 25, (9), 1897–1907, doi: 10.1681/ASN.2013101062.
- [40] Schmidt, J. A., Rinaldi, S., Scalbert, A., Ferrari, P., Achaintre, D., Gunter, M. J., Appleby, P. N., Key, T. J., Travis, R. C., „Plasma concentrations and intakes of amino acids in male meat-eaters, fish-eaters, vegetarians and vegans: a cross-sectional analysis in the EPIC-Oxford cohort“, — *European Journal of Clinical Nutrition*, 2016, 70, (3), 306–312, doi: 10.1038/ejcn.2015.144.
- [41] Cynober, L. A., „Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance“, — *Nutrition*, 2002, 18, (9), 761–766, doi: 10.1016/S0899-9007(02)00780-3.
- [42] van de Poll, M. C. G., Soeters, P. B., Deutz, N. E. P., Fearon, K. C. H., Dejong, C. H. C., „Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange“, — *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 79, (2), 185–197, doi: 10.1093/ajcn/79.2.185.
- [43] Zha, Y., Qian, Q., „Protein nutrition and malnutrition in CKD and ESRD“, — *Nutrients*, 2017, 9, 208, doi: 10.3390/nu9030208.
- [44] Garibotto, G., Bonanni, A., Verzola, D., „Effect of kidney failure and hemodialysis on protein and amino acid metabolism“, — *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2012, 15, (1), 78–84, doi: 10.1097/MCO.0b013e32834d9df6.

- [45] Murtas, S., Aquilani, R., Deiana, M. L., Iadarola, P., Secci, R., Cadeddu, M., Salis, S., Serpi, D., Bolasco, P., „Differences in Amino Acid Loss Between High-Efficiency Hemodialysis and Postdilution and Predilution Hemodiafiltration Using High Convection Volume Exchange—A New Metabolic Scenario? A Pilot Study“, — *Journal of Renal Nutrition*, 2019, 29, (2), 126–135, doi: 10.1053/j.jrn.2018.07.005.
- [46] Iacone, R., Scanzano, C., Santarpia, L., Cioffi, I., Contaldo, F., Pasanisi, F., „Macronutrients in Parenteral Nutrition: Amino Acids“, — *Nutrients*, 2020, 12, (3), 772, doi: 10.3390/nu12030772.
- [47] Alp Ikizler, T., Cano, N. J., Franch, H., Fouque, D., Himmelfarb, J., Kalantar-Zadeh, K., Kuhlmann, M. K., Stenvinkel, P., TerWee, P., Teta, D., Wang, A. Y.-M., Wanner, C., „Prevention and treatment of protein energy wasting in chronic kidney disease patients: a consensus statement by the International Society of Renal Nutrition and Metabolism“, — *Kidney International*, 2013, 84, (6), 1096–1107, doi: 10.1038/ki.2013.147.
- [48] Raj, D. S. C., Moseley, P., Dominic, E. A., Onime, A., Tzamaloukas, A. H., Boyd, A., Shah, V. O., Glew, R., Wolfe, R., Ferrando, A., „Interleukin-6 modulates hepatic and muscle protein synthesis during hemodialysis“, — *Kidney International*, 2008, 73, (9), 1054–1061, doi: 10.1038/ki.2008.21.
- [49] Kalantar-Zadeh, K., Block, G., McAllister, C. J., Humphreys, M. H., Kopple, J. D., „Appetite and inflammation, nutrition, anemia, and clinical outcome in hemodialysis patients“, — *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 80, (2), 299–307, doi: 10.1093/ajcn/80.2.299.
- [50] Feroze, U., Noori, N., Kovesdy, C. P., Molnar, M. Z., Martin, D. J., Reina-Patton, A., Benner, D., Bross, R., Norris, K. C., Kopple, J. D., Kalantar-Zadeh, K., „Quality-of-Life and Mortality in Hemodialysis Patients: Roles of Race and Nutritional Status“, — *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2011, 6, (5), 1100–1111, doi: 10.2215/CJN.07690910.
- [51] Kovesdy, C. P., Kalantar-Zadeh, K., „Why Is Protein–Energy Wasting Associated With Mortality in Chronic Kidney Disease?“, — *Seminars in Nephrology*, 2009, 29, (1), 3–14, doi: 10.1016/j.semnephrol.2008.10.002.

- [52] Hendriks, F. K., Smeets, J. S. J., Broers, N. J. H., van Kranenburg, J. M. X., van der Sande, F. M., Kooman, J. P., van Loon, L. J. C., „End-Stage Renal Disease Patients Lose a Substantial Amount of Amino Acids during Hemodialysis“, — *The Journal of Nutrition*, 2020, 150, (5), 1160–1166, doi: 10.1093/jn/nxaa010.
- [53] Kopple, J. D., „National Kidney Foundation K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Nutrition in Chronic Renal Failure“, — *American Journal of Kidney Diseases*, 2001, 37, (1), 66–70, doi: 10.1053/ajkd.2001.20748.
- [54] Marsen, T. A., Beer, J., Mann, H., „Intradialytic parenteral nutrition in maintenance hemodialysis patients suffering from protein-energy wasting. Results of a multicenter, open, prospective, randomized trial“, — *Clinical Nutrition*, 2017, 36, (1), 107–117, doi: 10.1016/j.clnu.2015.11.016.
- [55] Cano, N. J. M., Fouque, D., Roth, H., Aparicio, M., Azar, R., Canaud, B., Chauveau, P., Combe, C., Laville, M., Leverve, X. M., „Intradialytic Parenteral Nutrition Does Not Improve Survival in Malnourished Hemodialysis Patients: A 2-Year Multicenter, Prospective, Randomized Study“, — *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007, 18, (9), 2583–2591, doi: 10.1681/ASN.2007020184.
- [56] Franch, H. A., Mitch, W. E., „Navigating Between the Scylla and Charybdis of Prescribing Dietary Protein for Chronic Kidney Diseases“, — *Annual Review of Nutrition*, 2009, 29, (1), 341–364, doi: 10.1146/annurev-nutr-080508-141051.
- [57] Shinaberger, C. S., Kilpatrick, R. D., Regidor, D. L., McAllister, C. J., Greenland, S., Kopple, J. D., Kalantar-Zadeh, K., „Longitudinal Associations Between Dietary Protein Intake and Survival in Hemodialysis Patients“, — *American Journal of Kidney Diseases*, 2006, 48, (1), 37–49, doi: 10.1053/J.AJKD.2006.03.049.
- [58] „Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation“, 2007. [WWW] <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43411>.
- [59] Sainio, E.-L., Pulkki, K., Young, S. N., „L-Tryptophan: Biochemical, nutritional and pharmacological aspects“, — *Amino Acids*, 1996, 10, (1), 21–47, doi: 10.1007/BF00806091.

- [60] Palego, L., Betti, L., Rossi, A., Giannaccini, G., „Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans“, — *Journal of Amino Acids*, 2016, 2016, 1–13, doi: 10.1155/2016/8952520.
- [61] Post, A., Huberts, M., Poppe, E., van Faassen, M., P. Kema, I., Vogels, S., M. Geleijnse, J., Westerhuis, R., J. R. Ipema, K., J. L. Bakker, S., F. M. Franssen, C., „Tryptophan Intake and Tryptophan Losses in Hemodialysis Patients: A Balance Study“, — *Nutrients*, 2019, 11, (12), 2851, doi: 10.3390/nu11122851.
- [62] Geisler, S., Mayersbach, P., Becker, K., Schennach, H., Fuchs, D., Gostner, J. M., „Serum tryptophan, kynurenine, phenylalanine, tyrosine and neopterin concentrations in 100 healthy blood donors“, — *Pteridines*, 2015, 26, (1), 31–36, doi: 10.1515/pterid-2014-0015.
- [63] Green, A. R., Aronson, J. K., Curzon, G., Woods, H. F., „Metabolism of an oral tryptophan load. I: Effects of dose and pretreatment with tryptophan.“, — *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1980, 10, (6), 603–610, doi: 10.1111/j.1365-2125.1980.tb00516.x.
- [64] Sallée, M., Dou, L., Cerini, C., Poitevin, S., Brunet, P., Burtey, S., „The Aryl Hydrocarbon Receptor-Activating Effect of Uremic Toxins from Tryptophan Metabolism: A New Concept to Understand Cardiovascular Complications of Chronic Kidney Disease“, — *Toxins*, 2014, 6, (3), 934–949, doi: 10.3390/toxins6030934.
- [65] Kameya, M., Onaka, H., Asano, Y., „Selective tryptophan determination using tryptophan oxidases involved in bis-indole antibiotic biosynthesis“, — *Analytical Biochemistry*, 2013, 438, (2), 124–132, doi: 10.1016/J.AB.2013.03.024.
- [66] Teale, F. W. J., Weber, G., „Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids“, — *Biochemical Journal*, 1957, 65, (3), 476–482, doi: 10.1042/bj0650476.
- [67] Öhrn, A., Karlström, G., „Simulations of the Absorption and Fluorescence of Indole in Aqueous Solution and at a Nonpolar/Polar Interface“, — *The Journal of Physical Chemistry A*, 2007, 111, (42), 10468–10477, doi: 10.1021/jp0744477.
- [68] Ghisaidoobe, A. B. T., Chung, S. J., „Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques“, — *International journal of molecular sciences*, 2014, 15, (12), 22518–22538, doi: 10.3390/ijms151222518.

- [69] McMenamy, R. H., Lund, C. C., Oncley, J. L., „Unbound Amino Acid Concentrations in Human Blood Plasmas“, — *The Journal of Clinical Investigation*, 1957, 36, (12), 1672–1679, doi: 10.1172/JCI103568.
- [70] Pardridge, W. M., „Tryptophan transport through the blood-brain barrier: In vivo measurement of free and albumin-bound amino acid“, — *Life Sciences*, 1979, 25, (17), 1519–1528, doi: [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(79\)90378-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(79)90378-3).
- [71] Taleb, S., „Tryptophan Dietary Impacts Gut Barrier and Metabolic Diseases“, — *Frontiers in Immunology*, 2019, 10, 2113, doi: 10.3389/fimmu.2019.02113.
- [72] Aronov, P. A., Luo, F. J.-G., Plummer, N. S., Quan, Z., Holmes, S., Hostetter, T. H., Meyer, T. W., „Colonic Contribution to Uremic Solutes“, — *Journal of the American Society of Nephrology*, 2011, 22, (9), 1769–1776, doi: 10.1681/ASN.2010121220.
- [73] Addi, T., Dou, L., Burtsey, S., „Tryptophan-Derived Uremic Toxins and Thrombosis in Chronic Kidney Disease“, — *Toxins*, 2018, 10, (10), 412, doi: 10.3390/toxins10100412.
- [74] Meyer, T. W., Hostetter, T. H., „Uremic solutes from colon microbes“, — *Kidney International*, 2012, 81, (10), 949–954, doi: 10.1038/ki.2011.504.
- [75] Leong, S., Sirich, T., „Indoxyl Sulfate—Review of Toxicity and Therapeutic Strategies“, — *Toxins*, 2016, 8, (12), 358, doi: 10.3390/toxins8120358.
- [76] Deltombe, O., Van Biesen, W., Glorieux, G., Massy, Z., Dhondt, A., Eloot, S., „Exploring Protein Binding of Uremic Toxins in Patients with Different Stages of Chronic Kidney Disease and during Hemodialysis“, — *Toxins*, 2015, 7, (10), 3933–3946, doi: 10.3390/toxins7103933.
- [77] Weissbach, H., King, W., Sjoerdsma, A., Udenfriend, S., „Formation of Indole-3-acetic Acid and Tryptamine in Animals: A METHOD FOR ESTIMATION OF INDOLE-3-ACETIC ACID IN TISSUES“, — *Journal of Biological Chemistry*, 1959, 234, (1), 81–86.
- [78] Koga, J., Syōono, K., Ichikawa, T., Adachi, T., „Involvement of l-tryptophan aminotransferase in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*“, — *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1994, 1209, (2), 241–247, doi: 10.1016/0167-4838(94)90191-0.
- [79] Gotch, F. A., Sargent, J. A., „A mechanistic analysis of the National Cooperative Dialysis Study (NCDS)“, — *Kidney International*, 1985, 28, (3), 526–534, doi: 10.1038/KI.1985.160.

- [80] Owen, W. F., Lew, N. L., Liu, Y., Lowrie, E. G., Lazarus, J. M., „The Urea Reduction Ratio and Serum Albumin Concentration as Predictors of Mortality in Patients Undergoing Hemodialysis“, — *New England Journal of Medicine*, 1993, 329, (14), 1001–1006, doi: 10.1056/NEJM199309303291404.
- [81] Canaud, B., Bosc, J. yves, Vaussenat, F., Leray-Moragues, H., Leblanc, M., Garred, L. J., Mion, C., „Quantitation in Hemodialysis: Adequacy Measurement Revisited“, — *Seminars in Dialysis*, 1999, 12, (5), 370–375, doi: 10.1046/j.1525-139X.1999.99061.x.
- [82] Fridolin, I., Magnusson, M., Lindberg, L.-G., „On-Line Monitoring of Solutes in Dialysate Using Absorption of Ultraviolet Radiation: Technique Description“, — *The International Journal of Artificial Organs*, 2002, 25, (8), 748–761, doi: 10.1177/039139880202500802.
- [83] „Adimea real-time monitoring process“, 2014. [WWW] <https://www.bbraun.com/en/products/b0/adimea.html> (5. 01. 2020).
- [84] Holmar, J., Uhlin, F., Ferenets, R., Lauri, K., Tanner, R., Arund, J., Luman, M., Fridolin, I., „Estimation of removed uremic toxin indoxyl sulphate during hemodialysis by using optical data of the spent dialysate“, *2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, 2013, 6707–6710, doi: 10.1109/EMBC.2013.6611095.
- [85] Lisowska-Myjak, B., „Uremic Toxins and Their Effects on Multiple Organ Systems“, — *Nephron Clinical Practice*, 2014, 128, (3–4), 303–311, doi: 10.1159/000369817.
- [86] Wilcox, A. A., Carroll, W. E., Sterling, R. E., Davis, H. A., Ware, A. G., „Use of the Berthelot Reaction in the Automated Analysis of Serum Urea Nitrogen“, — *Clinical Chemistry*, 1966, 12, (3), 151–157, doi: 10.1093/clinchem/12.3.151.
- [87] Jung, D., Biggs, H., Erikson, J., Ledyard, P. U., „New Colorimetric Reaction for End-Point, Continuous-Flow, and Kinetic Measurement of Urea“, — *Clinical Chemistry*, 1975, 21, (8), 1136–1140, doi: 10.1093/clinchem/21.8.1136.
- [88] Zawada, R. J. X., Kwan, P., Olszewski, K. L., Llinas, M., Huang, S.-G., „Quantitative determination of urea concentrations in cell culture medium“, — *Biochemistry and Cell Biology*, 2009, 87, (3), 541–544, doi: 10.1139/O09-011.



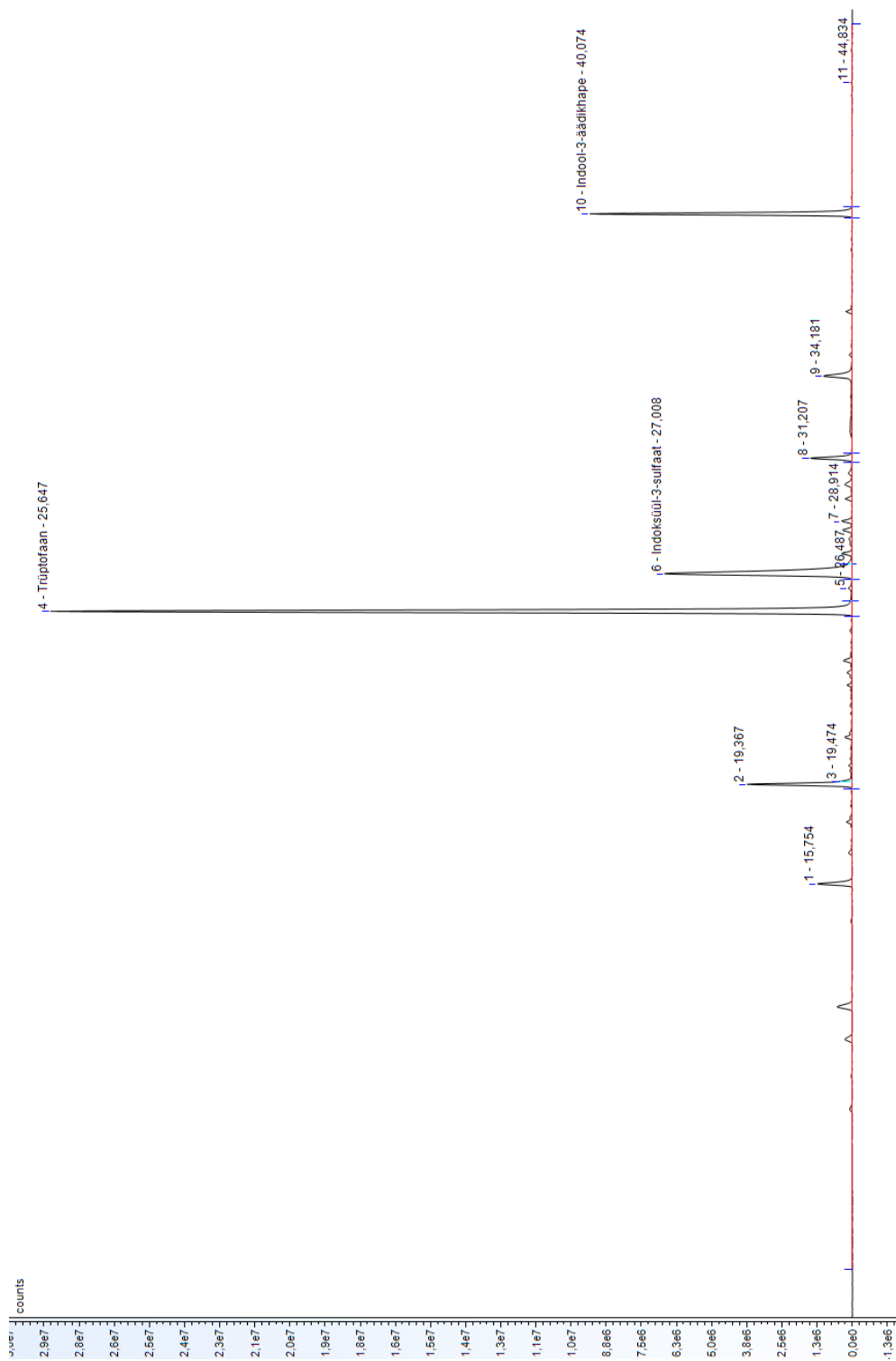
- [89] Velychko, T. P., Soldatkin, O. O., Melnyk, V. G., Marchenko, S. V., Kirdeciler, S. K., Akata, B., Soldatkin, A. P., El'skaya, A. V., Dzyadevych, S. V., „A Novel Conductometric Urea Biosensor with Improved Analytical Characteristic Based on Recombinant Urease Adsorbed on Nanoparticle of Silicalite“, — *Nanoscale research letters*, 2016, 11, (1), 106, doi: 10.1186/s11671-016-1310-3.
- [90] Tvarijonaviciute, A., Pardo-Marin, L., Tecles, F., Carrillo, J. D., Garcia-Martinez, J. D., Bernal, L., Pastor, J., Cerón, J. J., Martinez-Subiela, S., „Measurement of urea and creatinine in saliva of dogs: a pilot study“, — *BMC veterinary research*, 2018, 14, (1), 223, doi: 10.1186/s12917-018-1546-5.
- [91] „Urea Nitrogen“, 2019. [WWW] [https://www.beckmancoulter.com/download/phxBAOSR6X3411-EN\\_US](https://www.beckmancoulter.com/download/phxBAOSR6X3411-EN_US) (4. 01. 2020).
- [92] Fushimi, Y., Tatebe, J., Okuda, Y., Ishii, T., Ujiie, S., Morita, T., „Performance evaluation of an Indoxyl Sulfate Assay Kit “NIPRO”“, — *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 2019, 57, (11), 1770–1776, doi: 10.1515/cclm-2019-0218.
- [93] Gang, S., Sharma, S., Saraf, M., Buck, M., Schumacher, J., „Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski method“, — *BIO-PROTOCOL*, 2019, 9, (9), e3230, doi: 10.21769/BioProtoc.3230.
- [94] Zhu, W., Stevens, A. P., Dettmer, K., Gottfried, E., Hoves, S., Kreutz, M., Holler, E., Canelas, A. B., Kema, I., Oefner, P. J., „Quantitative profiling of tryptophan metabolites in serum, urine, and cell culture supernatants by liquid chromatography–tandem mass spectrometry“, — *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 401, (10), 3249–3261, doi: 10.1007/s00216-011-5436-y.
- [95] Fornstedt, T., Forssén, P., Westerlund, D., „Basic HPLC Theory and Definitions: Retention, Thermodynamics, Selectivity, Zone Spreading, Kinetics, and Resolution“, *Analytical Separation Science*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2015, 1–24.
- [96] Žuvela, P., Skoczylas, M., Jay Liu, J., Bączek, T., Kaliszan, R., Wong, M. W., Buszewski, B., „Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography“, — *Chemical Reviews*, 2019, 119, (6), 3674–3729, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00246.

- [97] Czaplicki, S., „Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds“, *Column Chromatography*, London: InTech, 2013, 99–122.
- [98] Kanemitsu, Y., Asaji, K., Matsumoto, Y., Tsukamoto, H., Saigusa, D., Mukawa, C., Tachikawa, T., Abe, T., Tomioka, Y., „Simultaneous quantitative analysis of uremic toxins by LC–MS/MS with a reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange tri-modal mixed-mode column“, — *Journal of Chromatography B*, 2017, 1068–1069, 1–8, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.10.009>.
- [99] Walter, T. H., Andrews, R. W., „Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation“, — *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 63, 14–20, doi: [10.1016/j.trac.2014.07.016](https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.016).
- [100] Arund, J., „Major Chromophores and Fluorophores in the Spent Dialysate as Cornerstones for Optical Monitoring of Kidney Replacement Therapy“, Tallinn University of Technology, 2016.
- [101] Tissue, B. M., „Ultraviolet and Visible Absorption Spectroscopy“, *Characterization of Materials*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012, 1–13.
- [102] Kumar Panigrahi, S., Kumar Mishra, A., „Inner filter effect in fluorescence spectroscopy: As a problem and as a solution“, — *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2019, 41, 100318, doi: [10.1016/j.jphotochemrev.2019.100318](https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2019.100318).
- [103] Eloot, S., Dhondt, A., Vierendeels, J., De Wachter, D., Verdonck, P., Vanholder, R., „Temperature and concentration distribution within the Genius® dialysate container“, — *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2007, 22, (10), 2962–2969, doi: [10.1093/ndt/gfm356](https://doi.org/10.1093/ndt/gfm356).
- [104] Debnath, S., Velagapudi, C., Redus, L., Thameem, F., Kasinath, B., Hura, C. E., Lorenzo, C., Abboud, H. E., O'Connor, J. C., „Tryptophan Metabolism in Patients With Chronic Kidney Disease Secondary to Type 2 Diabetes: Relationship to Inflammatory Markers“, — *International Journal of Tryptophan Research*, 2017, 10, 117864691769460, doi: [10.1177/1178646917694600](https://doi.org/10.1177/1178646917694600).
- [105] Małgorzewicz, S., Gałęzowska, G., Cieszyńska-Semenowicz, M., Ratajczyk, J., Wolska, L., Rutkowski, P., Jankowska, M., Rutkowski, B., Dębska-Ślizień, A., „Amino acid profile after oral nutritional supplementation in hemodialysis patients with protein-energy wasting“, — *Nutrition*, 2019, 57, 231–236, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.06.013>.

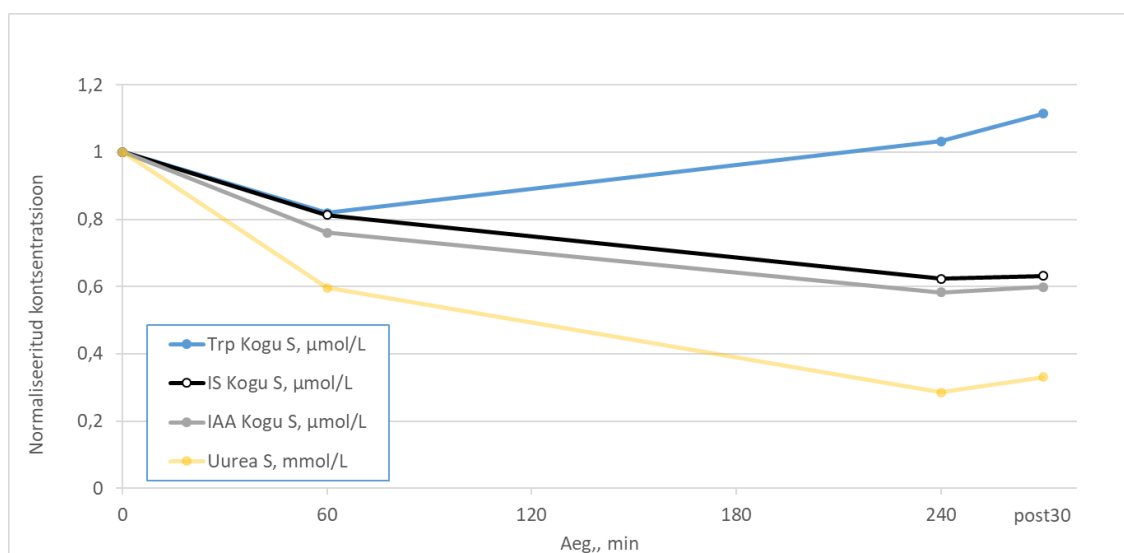
- [106] Taylor, M. W., Feng, G., „Relationship between interferon- $\gamma$ , indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism“, — *The FASEB Journal*, 1991, 5, (11), 2516–2522, doi: 10.1096/fasebj.5.11.1907934.
- [107] König, P., Nagl, C., Neurauter, G., Schennach, H., Brandacher, G., Fuchs, D., „Enhanced degradation of tryptophan in patients on hemodialysis“, — *Clinical nephrology*, 2010, 74, 465–470, doi: 10.5414/CNP74465.
- [108] Vaziri, N. D., Zhao, Y.-Y., Pahl, M. V., „Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms, consequences and potential treatment“, — *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2015, 31, (5), 737–746, doi: 10.1093/ndt/gfv095.
- [109] Poesen, R., Windey, K., Neven, E., Kuypers, D., De Preter, V., Augustijns, P., D’Haese, P., Evenepoel, P., Verbeke, K., Meijers, B., „The Influence of CKD on Colonic Microbial Metabolism“, — *Journal of the American Society of Nephrology*, 2016, 27, (5), 1389–1399, doi: 10.1681/ASN.2015030279.
- [110] Badawy, A.-B., „Plasma free tryptophan revisited: what you need to know and do before measuring it“, — *Journal of Psychopharmacology*, 2008, 24, (6), 809–815, doi: 10.1177/0269881108098965.
- [111] Fabresse, N., Uteem, I., Lamy, E., Massy, Z., Larabi, I. A., Alvarez, J.-C., „Quantification of free and protein bound uremic toxins in human serum by LC-MS/MS: Comparison of rapid equilibrium dialysis and ultrafiltration“, — *Clinica Chimica Acta*, 2020, 507, 228–235, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.032>.
- [112] Stegmayr, B., „Uremic Toxins and Lipases in Haemodialysis: A Process of Repeated Metabolic Starvation“, *Toxins*, 6, (5). 2014, doi: 10.3390/toxins6051505.
- [113] Shibasaki, T., Matsuda, H., Ohno, I., Gomi, H., Nakano, H., Misawa, T., Abe, S., Ishimoto, F., Kisugi, R., Ikeda, K., Machida, K., Sakai, O., „Significance of Serum Lipase in Patients Undergoing Hemodialysis“, — *American Journal of Nephrology*, 1996, 16, (4), 309–314, doi: 10.1159/000169015.
- [114] SAKAI, T., TAKADATE, A., OTAGIRI, M., „Characterization of Binding Site of Uremic Toxins on Human Serum Albumin“, — *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1995, 18, (12), 1755–1761, doi: 10.1248/bpb.18.1755.

- [115] Cunningham, V. J., Hay, L., Stoner, H. B., „The binding of L-tryptophan to serum albumins in the presence of non-esterified fatty acids“, — *Biochemical Journal*, 1975, 146, (3), 653–658, doi: 10.1042/bj1460653.
- [116] Deltombe, O., de Loor, H., Glorieux, G., Dhondt, A., Van Biesen, W., Meijers, B., Eloot, S., „Exploring binding characteristics and the related competition of different protein-bound uremic toxins“, — *Biochimie*, 2017, 139, 20–26, doi: 10.1016/j.biochi.2017.05.010.
- [117] Näsström, B., Stegmayr, B., Olivecrona, G., Olivecrona, T., „Lipoprotein lipase in hemodialysis patients: indications that low molecular weight heparin depletes functional stores, despite low plasma levels of the enzyme“, — *BMC Nephrology*, 2004, 5, (1), 17, doi: 10.1186/1471-2369-5-17.

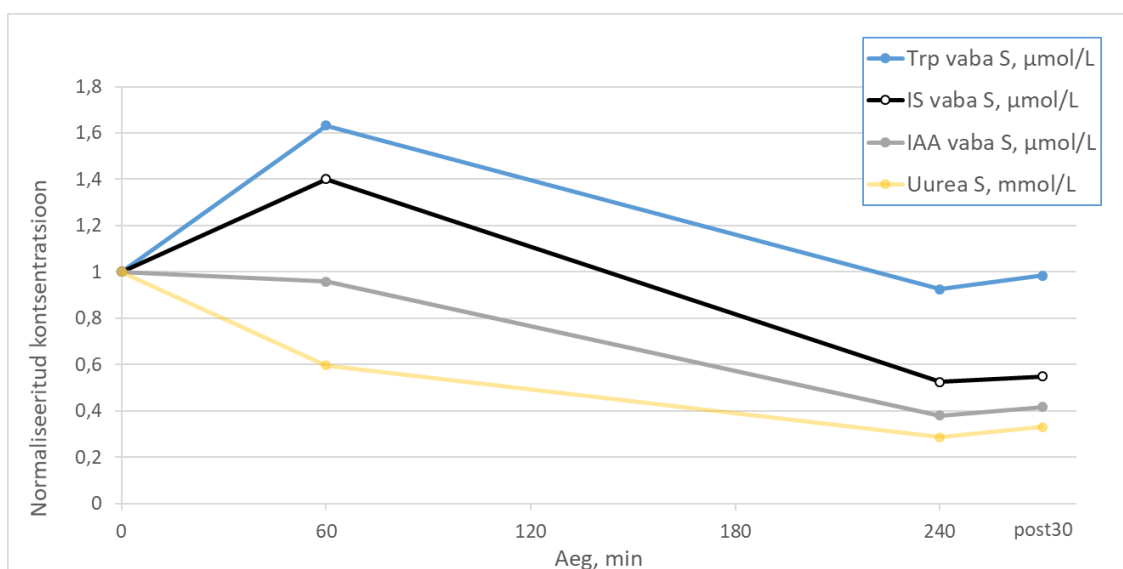
# Lisa 1 – HPLC-ga analüüsitud hetidialüsaadi proovi kromatogramm, millel on määratud Trp-i, IS-i ja IAA piigid



**Lisa 2 – Trp-i, IS-i, IAA kogu ainehulga ja uurea keskmised kontsentratsioonid vereseerumis normaliseerituna dialüüsieelsete kontsentratsioonide suhtes kõikide patsientide üleselt (n = 310)**



**Lisa 3 – Trp-i, IS-i, IAA vaba ainehulga ja uurea keskmised kontsentratsioonid vereseerumis normaliseerituna dialüüsieelsete kontsentratsioonide suhtes kõikide patsientide üleselt (n = 310)**



**Lisa 4 – Trp-i, IS-i, IAA ja urea keskmised  
kontsentratsioonid heitdialüsaadis normaliseerituna  
dialüüsieelsete kontsentratsioonide suhtes kõikide patsientide  
üleselt (n = 257)**

