

# Rigiditatea arterială și metilarea aberantă ADN la pacienții cu insuficiență renală terminală: hemodializă versus hemodiafiltrare

---

Doctorand **Adrian-Bogdan Ghigolea**

---

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Mirela Gherman-Căprioară**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CUPRINS

|                                                                        |   |
|------------------------------------------------------------------------|---|
| <b>CUVINTE CHEIE</b>                                                   | 2 |
| <b>INTRODUCERE</b>                                                     | 2 |
| Studiul 1 – Rigiditate arterială: hemodializă versus hemodiafiltrare   | 2 |
| Studiul 2 – Metilarea aberantă ADN: hemodializă versus hemodiafiltrare | 6 |
| <b>CONCLUZII GENERALE</b>                                              | 8 |
| <b>ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI</b>             | 9 |

**CUVINTE CHEIE:** rigiditate arterială, metilare ADN, hemodializă, hemodiafiltrare, insuficiență renală terminală, inflamație.

## INTRODUCERE

Teza și-a propus să studieze rigiditatea arterială și gradul metilării ADN, factori de risc non-tradiționali pentru mortalitate, la pacienții cu insuficiență renală terminală, din prisma a două tehnici de hemodializă: hemodializă high-flux și hemodiafiltrarea on-line în postdiluție, cu volume mari de substituție.

### **Studiul 1. Rigiditate arterială: hemodializă versus hemodiafiltrare**

Rigiditatea arterială reprezintă suma modificărilor structurale, mecanice, biochimice și presionale ale peretelui arterial. Consecințele modificării rigidității arteriale pot fi apreciate din analiza undei de puls. Proprietățile undei de puls sunt afectate pe de o parte de complianța, distensibilitatea și elasticitatea peretelui aortic iar pe de altă parte de rezistența vasculară periferică. Măsura acestor modificări structurale și funcționale sunt: indicii de augmentare care reflectă capacitatea efectivă de dilatare arteriolară și rezistența vasculară periferică și viteza undei de puls (PWV) care s-a dovedit a fi un marker fidel al rigidității peretelui arterial și oferă informații despre structura și funcțiile sale.

Rigiditatea arterială este unul dintre cei mai importanți factori predictivi independenți pentru evenimentele cardiovasculare din boala renală în stadiul terminal (IRT). Diferitele metode de tratament ale IRT au efecte diferite asupra parametrilor rigidității arteriale. Recent s-a dovedit că hemodiafiltrarea online (HDF) cu volume mari de substituție ar avea efecte benefice asupra morbidității și mortalității cardiovasculare. Cunoștințele privind rolul HDF asupra parametrilor rigidității arteriale sunt limitate și contradictorii. Nu există studii care să compare din acest punct de vedere efectul metodelor cele mai utilizate de hemodializă, asupra rigidității arteriale: hemodiafiltrarea online și hemodializa high-flux.

În aceste condiții ne-am propus să studiem ipoteza că pacienții tratați cu hemodiafiltrare online în post-diluție ar avea parametrii de rigiditate arterială mai buni

---

comparativ cu pacienții tratați cu hemodializă high-flux (HD). Obiectivul studiului a fost compararea vitezei undei de puls (PWV), a indicilor de augmentație (AIx), a timpului de retur al undei de puls (TR) și al ariei de reflexie diastolică (ARD) și de asemenea de a stabili determinanții rigidității arteriale (legați de dializă, demografici și biologici).

Am condus un studiu transversal pe parcursul a douăsprezece luni, într-un singur centru de dializă, în care au fost incluși patruzeci și șase de pacienți non-diabetici, egal distribuiți între HD și HDF. Criteriile de selecție au fost: vârsta 18 - 80, de ani, trei ședințe de dializă cu durată de 4 ore, stabil pe cel puțin șase luni și debit sangvin de peste 250 mL/min; criterii de excludere: fumătorii, diabeticii, malignitate activă, infecții acute, boli autoimune, tratament imunosupresor în curs, hepatită virală cronică B sau C, infecție HIV, fibrilație atrială, valvulopatii severe, proteză aortică. Pentru dializă au fost utilizate dializoare high-flux Helixone (FX 60, 80 sau 100), aparate de dializă 4008S pentru HD respectiv 5008 pentru HDF. Grupul martor a fost constituit din 7 subiecți sănătoși, normotensivi și normoponderali, cu vârstă similară loturilor de studiu (media de vârstă de 50 de ani). Loturile au fost comparate folosind testul Student-t, testul U Mann-Whitney sau testul X-pătrat, după caz. Pentru studiul corelațiilor s-au recurs la regresia liniară simplă și multiplă de tip stepwise.

Din cunoștințele noastre acesta este primul studiu care compară diferențele de rigiditate arterială între metodele de dializă moderne: hemodializa high-flux și hemodiafiltrarea online. Rigiditatea arterială este crescută la populația pacienților dializați discordant față de persoane sănătoase de aceeași vârstă și același sex. Și în studiul nostru pacienții dializați, atât cei tratați cu HD cât și prin HDF, au avut rigiditate arterială net crescută comparativ cu lotul martor, fapt concordant cu literatura de specialitate. Dintre pacienții dializați, parametrii rigidității arteriale au fost semnificativ statistic mai buni la pacienții tratați cu hemodiafiltrare online față de cei tratați cu hemodializă high-flux. Dacă ținem cont de intervalul de valori normale al metodei, putem spune că la lotul HDF media PWV s-a încadrat în intervalul de valori normale pe când la lotul HD valoarea medie a PWV a fost crescută iar AIx a fost crescut la lotul HDF și anormal crescut la lotul HD. În termeni patogenic acestea semnifică: pentru HDF o distensibilitate aortică mai bună și o creștere mai mică a rezistenței arteriale periferice iar pentru HD rigiditate aortică marcată și creștere severă a rezistenței arteriale periferice. În consecință excesul de rigiditate arterială demonstrat la pacienții tratați cu HD a fost atât consecința reducerii elasticității peretelui arterial pusă în evidență de nivelele crescute ale PWV și de scurtarea TR, cât și a reducerii distensibilității arteriale și arteriolare, extrapolată din creșterea majoră a indicilor de augmentație aortic și brahial. Rezultatele noastre sunt cu atât mai importante cu cât nu au existat diferențe statistice între loturile de pacienți dializați în ceea ce privește: vârsta, sexul, vechimea în dializă, volum sangvin procesat, debitul sangvin sau kT/V. Diferența de rigiditate arterială ar putea fi explicată în aceste condiții de capacitatea superioară de epurare pe un spectru mult mai larg de greutate moleculare prin hemodiafiltrare online decât prin hemodializa high-flux.

Studiile ce au investigat posibilitățile de creștere a supraviețuirii la pacienții dializați au pus în prim-plan beneficiile evidente ale tratamentului cu hemodiafiltrare online comparativ cu hemodializa convențională: HEMO, MPO, CONTRAST, Ok et al, ESHOL,

Canaud et al. Știind că creșterea rigidității arteriale la pacienții dializați cronic este un factor predictor independent major pentru mortalitatea globală și cardiovasculară am putea presupune că ameliorarea rigidității arteriale prin hemodiafiltrare online ar putea influența favorabil speranța de viață a pacienților dializați.

Inflamația cronică sistemică crește riscul de evenimente cardiovasculare și riscul de deces la pacienții hemodializați. În studiul RISCVID inflamația a fost un important factor predictiv pentru mortalitatea globală și cardiovasculară. Cu toate acestea, același studiu a subliniat faptul că în ciuda inflamației, tratamentul cu hemodiafiltrare online poate crește supraviețuirea, independent de doza de dializă, comparativ cu dializa convențională. În studiul nostru, la ambele loturi de pacienți dializați s-au înregistrat nivele crescute ale PCR și feritinei serice, în lipsa unor infecții acute sau cornice, clinic manifeste (criterii de excludere prestabilite). Un studiu recent a demonstrat că nivelul feritinei serice se asociază cu progresia rigidității arteriale, mai ales la valori de  $>500$  ng/mL. Rezultatele noastre au pus în evidență existența unei corelații pozitive puternice între feritină și PCR. În analiză multivariată însă doar nivelul seric al feritinei a fost predictor independent pentru PWV ( $\beta = 0,45$ ;  $p = 0,018$ ;  $R^2\text{-ajustat} = 0,36$ ) la lotul HDF. Aceste rezultate sugerează existența unui efect negativ al inflamației cronice asupra rigidității arteriale, independent de alți factori de risc legați de ateroscleroză.

Hipoalbuminemia este unul dintre factorii de risc non-tradiționali, cu impact major asupra supraviețuirii la pacienții hemodializați cronic. Riscul relativ de deces crește semnificativ la pacienții tratați cu hemodializă convențională, în condiții de hipoalbuminemie  $< 3,8$  g/dL. În studiul nostru valorile medii pentru albuminemie s-au situat la limita inferioară a intervalului normal:  $3,9 \pm 0,2$  g/dL la HD respectiv  $3,8 \pm 0,3$  g/dL la lotul HDF. Am descoperit la lotul HD existența unei corelații puternice, negative între albuminemie și PWV respectiv TR. Mai mult chiar albuminemia a fost singurul factor predictiv independent pentru PWV și TR la pacienții HD, cu influență puternică asupra rigidității arteriale așa cum a rezultat din analiza statistică multivariată ( $\beta = -7,99$ ;  $p < 0,001$ ;  $F = 32,30$ ;  $R^2\text{-ajustat} = 0,59$ ). Relația patogenetică dintre rigiditate arterială și hipoalbuminemie la pacienții dializați ar putea fi mediată de creșterea stresului oxidativ și a disfuncției endoteliale. Răsunetul clinic al tuturor acestora a fost evaluată în studii precum trialul MPO. Acesta s-a concentrat pe studiul efectelor HDF asupra supraviețuirii la pacienții cu valori scăzute ale albuminiei serice și risc înalt de mortalitate. Beneficiile hemodiafiltrării asupra supraviețuirii au fost amplificate la acest grup de risc înalt. Trebuie menționat că deși valorile PCR au fost crescute la ambele loturi de pacienți dializați, nu am evidențiat corelații între albuminemie și markerii inflamației. Ținând cont de rezultatele studiului nostru și de datele din literatură putem presupune că ar exista un beneficiu clar care să susțină și să justifice trecerea pacienților hipoalbuminemici cu rigiditatea arterială crescută, cu risc vital înalt, de pe HD pe HDF.

Software-ul Arteriograph IrDA calculează câțiva markeri de fitness cardiac printre care ARD; acesta s-a calculat pe curba undei de puls în funcție de durata diastolei și diferența dintre curba teoretică și cea măsurată a curbei presiunii diastolice, oferind informații legate de calitatea umplerii diastolice a arterelor coronare. În studiul nostru am

---

găsit o reducere semnificativă a ARD la lotul HD comparativ cu lotul martor ( $p = 0,013$ ). Dacă ARD oglindește reducerea perfuziei cardiace diastolice și aceasta este o cauză a disfuncției diastolice atunci relația cu rigiditatea arterială încheie un cerc vicios cunoscut în literatura de specialitate. Reducerea ARD ar putea fi în acest caz consecința excesului de rigiditate arterială caracteristică lotului de pacienți hemodializați din studiul nostru. Prin contrast cu aceștia, ARD la pacienții tratați cu HDF a fost mai mare, fără a diferi semnificativ față de lotul martor sugerând o umplere coronariană diastolică mai bună. La lotul HDF, HDL-colesterolul a fost singurul factor predictiv independent pentru ARD, puternic din punct de vedere statistic ( $\beta = 0,72$ ;  $p = 0,001$ ;  $F = 17,88$ ;  $R^2\text{-ajustat} = 0,70$ ). La lotul HD însă, TAD a fost factor predictiv independent pentru ARD în analiză multivariată. Rezultatele noastre ar putea susține rolurile protectoare importante, ale normalizării HDL-colesterolului și a tensiunii arteriale, asupra umplerii coronariene diastolice și astfel un posibil rol favorabil asupra funcției cardiace în strânsă relație cu reducerea rigidității arteriale.

Pacienții HDF studiați de noi au avut un status nutrițional mai bun comparativ cu pacienții HD, fapt sugerat de nivelele crescute ale: trigliceridelor, creatininei și saturației transferinei. La pacienții HD parametrii rigidității arteriale (PWV, TR, AlxAo și AlxBr) s-au corelat puternic-negativ cu nivelele trigliceridelor și albuminei serice iar în analiză multivariată nivelul trigliceridelor și HDL-colesterolului seric au fost factori predictivi independenți pentru indicii de augmentație.

La pacienții HDF presiunea sistolică aortică și brahială, precum și presiunea arterială diastolică s-au corelat puternic-pozitiv și au fost predictorii independenți ai Alx. Deși indicii de augmentație au fost crescuți și la pacienții HD, aceștia nu s-au corelat cu presiunea arterială. Dacă ținem cont de faptul că cea mai mare parte a decreșterii tensionale are loc la nivelul arterelor mici și arteriolelor, am putea presupune că excesul de creștere al Alx la pacienții HD ar semnifica creșterea rezistenței vasculare periferice și disfuncție endotelială. În literatura de specialitate, prin creșterea dozei de dializă s-a obținut un control tensional mai bun dar efectele asupra rigidității arteriale au fost contrandictorii. Rezultatele noastre ar sugera că un control tensional mai bun ar putea avea efect benefic asupra rigidității arteriale la pacienții tratați cu HDF.

Vârsta este unul dintre factorii cel mai frecvent asociați cu rigiditatea arterială. În studiul nostru, vârsta a fost factor predictiv independent pentru TR iar vechimea în dializă a prezis, în analiză univariată, PWV și TR la pacienții HD dar și-a pierdut semnificația statistică în regresie multiplă.

Limitările studiului de față ar putea fi legate de natura transversală și numărul redus de subiecți incluși. Se impun studii prospective, randomizate cu perioadă de urmărire extinsă pentru clarificarea contribuției metodei de dializă la rigiditatea arterială.

În concluzie hemodiafiltrarea online pare să confere pacienților dializați cronic un profil de rigiditate arterială semnificativ mai bun decât hemodializa high-flux. Beneficiul a fost independent de vârstă, vechimea în dializă sau doza de dializă. S-ar părea că rigiditatea arterială crescută la pacienții HD s-ar reflecta în statusul nutrițional și povara aterosclerotică. La lotul HDF rigiditatea arterială a fost influențată de inflamație și presiunea arterială. În plus s-ar putea să existe o legătură între rigiditatea arterială și

performanța cardiacă explicată prin reducerea umplerii cardiace diastolice. Rezultatele noastre ar sugera că HDF ar putea avea un efect benefic important asupra rigidității arteriale.

## **Studiul 2. Metilarea aberantă ADN: hemodializă versus hemodiafiltrare**

Cea mai frecventă modificare epigenetică este metilarea ADN, proces ce are în general efect represor asupra expresiei genice. Metilarea aberantă a ADN a fost documentată la pacienții aflați în tratament de substituție extracorporeală a funcției renale prin diferite metode: hemodializă convențională, hemodializă high flux sau dializă peritoneală. Nu am identificat însă studii care să analizeze metilarea ADN în relație cu tehnica de dializă. Nivelul de metilare al ADN este influențat de numeroși factori precum: vârsta, sexul, infecțiile sau statusul nutrițional. La aceștia se adaugă factori legați de uremie precum: inflamația, hiperhomocisteinemia, stresul oxidativ, dislipidemia, deficitul vitaminic. Puține studii și-au propus să studieze însă metilarea ADN la pacienții dializați iar informațiile legate de posibila influență a tehnicii de dializă asupra metilării ADN sunt rare. O simplă interogare a bazei de date PubMed folosind termenii “DNA methylation” și “Dialysis” a oferit doar 29 de lucrări publicate. Cele mai relevante dintre acestea pentru studiul nostru au avut rezultate contradictorii. Cercetătorii au descoperit atât hipometilare cât și hipermetilare DNA la pacienții dializați.

Metoda cea mai utilizată pentru substituția extracorporeală a funcției renale este, la nivel mondial, hemodializa. Hemodiafiltrarea on-line este o metodă de substituție a funcției renale, mai eficientă, cu efecte benefice asupra supraviețuirii cardiovasculare. Pornind de la aceste dovezi și de la faptul că nu am găsit studii care să compare gradul metilării ADN la tehnici de dializă diferite, ne-am propus să evaluăm gradul global de metilare al ADN extras din sânge periferic integral, pentru hemodializa high-flux și hemodiafiltrarea online postdiluție.

Am condus un studiu transversal de tip caz-martor în care au fost incluși optzeci de pacienți non-diabetici dintr-un singur centru de dializă ce efectuau minim trei ședințe de patru ore săptămânal cu debit sangvin minim 250 mL/min, vechimea în dializă de minim șase luni. Criterii de excludere: vârsta peste 80 de ani, fumători, diabet zaharat, malignitate activă cunoscută, boli autoimune, tratament imunosupresor în curs, infecție cronică cu VHB, VHC sau HIV, fibrilație atrială, valvulopatii avansate, proteză aortică indiferent de nivel. Etiologia IRT a fost: nefroscleroză (n=47), boală renală polichistică autosomal-dominantă (n=13), glomerulopatie (n=13) sau uropatie obstructivă (n=7). Accesul vascular pentru dializă a fost: fistulă arteriovenoasă cu vase native (n=71) sau cateter tunelizat biluminal (n=9). Lotul martor a fost alcătuit din nouă subiecți de vârstă similară loturilor studiate (vârsta medie de 50 de ani), normoponderali și normotensivi.

Pentru analiza ADN din sânge periferic integral s-au utilizat kituri produse de Zymo Research iar determinările au fost efectuate în Laboratoarele USAMV Cluj-Napoca. A fost efectuată o singură măsurătoare de rigiditate arterială folosind metoda oscilometrică, cu Arteriograph IrDA (TensioMed, Budapest, Hungary). Pentru analiza statistică, variabilele au fost exprimate ca medie  $\pm$  deviație standard. Loturile au fost comparate folosind testul

---

Student-t, testul U Mann-Whitney (distribuție non-normală) sau testul X-pătrat, după caz. Pentru studiul corelațiilor s-a recurs la regresia liniară simplă și multiplă de tip stepwise (coeficienți de corelație Pearson sau Spearman, după caz).

În studiul nostru am găsit metilare globală ADN crescută la pacienții dializați comparativ cu martorii. Cel mai notabil a fost faptul că metilarea globală a ADN a fost semnificativ mai înaltă la pacienții tratați cu hemodializă high-flux comparativ cu pacienții tratați cu HDF on-line. Distribuția metilării ADN între cele două loturi a arătat că ADN a fost preponderant hipermetilat la pacenții tratați cu HD spre deosebire le pacienții tratați cu HDF la care ADN a fost preponderant hipometilat.

A existat o legătură semnificativă între gradul metilării ADN și tehnica de dializă (atât pentru HD cât și pentru HDF), gradul ridicat de inflamație, debitul sangvin, volumul sangvin procesat și PTHi. Cuantificând aceste asocierii am constatat existența unei corelații puternice a gradului de metilare al ADN cu tehnica de dializă dar și a unor corelații moderate negative al gradului metilării ADN cu debitul sangvin și volumul sangin procesat. Metoda de dializă a fost singurul factor predictiv pentru gradul de metilare globală a ADN (în regresie multplă), independent de: sex, vârstă, vechimea în dializă, accesul vascular, inflamație, debitul sangvin, volumul sangvin procesat sau de Kt/V.

Inflamația este un factor de risc cardiovascular important la pacienții dializați a cărui corelație cu hipermetilarea ADN a fost deja dovedită. În studiul nostru toți pacienții dializați au avut valori crescute ale PCR și ale feritinei serice. Pentru o valoare prag a PCR de 10 mg/L, gradul metilării ADN a fost semnificativ mai mic la HDF comparativ cu HD atât pentru pacienții cu inflamație sistemică cât și pentru cei fără sindrom inflamator sistemic. Inflamația sistemică anormal crescută, definită ca și PCR > 20 mg/L, s-a corelat cu tehnica de dializă astfel: pozitiv cu HD independent de vârstă, sex, vechimea în dializă, debitul sangvin, volumul sangvin procesat sau Kt/V. Am descoperit că nivelele cele mai înalte de metilare globală a ADN există la subgrupul pacienților hiper-inflamați tratați cu HD. Diferențe legate de tehnica de dializă au fost evidente și la pacienții cu nivele reduse de inflamație. Și la aceștia gradul metilării globale a ADN a fost mai înalt la HD decât la HDF. Carracedo și colab. au arătat că HDF on-line poate reduce generarea celulelor proinflamatorii și nivelele markerilor inflamației comparativ cu hemodializa convențională. Hipermetilarea aberantă a ADN la pacienții dializați ar putea fi legată de o stare pro-inflamatorie constantă care ar putea depinde de tehnica de dializă. În studiul nostru PCR, ca marker surogat pentru inflamație, și-a pierdut însă semnificația statistică în analiză multivariată.

Pacienții dializați incluși în studiul nostru au avut rigiditate arterială crescută mai ales pe seama creșterii indicilor de augmentație (aortic și brahial) pe când PWV s-a situat la limita superioară a valorilor acceptate ca normale. Stratificând pacienții după valoarea prag a PWV de 9,7 m/s am obținut rezultate comparabile cu cele pentru infalamație. Astfel gradul metilării ADN a fost mai mare la lotul HD comparativ cu HDF atât pentru pacienții cu rigiditate arterială crescută cât și pentru cei cu rigiditate arterială normală. Am remarcat că toți parametrii rigidității arteriale (PWV, AixAo, AixBr) s-au corelat cu vârsta la lotul HDF, fără asociere cu variabile legate de doza de dializă. Dimpotrivă, la lotul HD, PWV s-a corelat cu vechimea în dializă iar indicii de augmentație s-au corelat cu debitul

sangvin și volumul sangvin procesat. Am putea concluziona că prin eventuala creștere a debitului sangvin și/sau a volumului sangvin procesat ar putea fi influențati în mod favorabil indicii de augmentație și s-ar putea reduce astfel povara rigidității arteriale. Acest deziderat s-ar putea obține poate și prin schimbarea metodei de dializă prin trecerea de hemodializă la hemodiafiltrare.

Recunoaștem ca limitări ale studiului nostru următoarele: dimensiunea relativ redusă a eșantionului și lipsa datelor prospective legate de morbi-, mortalitate. Supraviețuirea pacienților aflați în program de hemodializă cronică este condiționată de un număr exhaustiv de factori de risc, listă la care ar putea fi adăugă și dereglarea mecanismelor epigenetice. S-ar părea că există o populație de pacienți hemodializați la risc foarte crescut, care au un grad ridicat de inflamație și de rigiditate arterială pe baza hipermetilării ADN. Studiul nostru este doar un tablou limitat în timp al metilării aberante a ADN și ale posibilelor relații patogenetice însă ar justifica continuarea cercetării printr-un studiu prospectiv, pe un număr crescut de pacienți. Un astfel de studiu ar putea clarifica eventualele beneficii ale HDF comparativ cu alte metode de epurare extracorporeale a funcției renale.

Studiul de față este, după cunoștințele noastre, primul care investighează influența tehnicii de dializă asupra statusului metilării ADN. Hemodializa pare să promoveze metilarea aberantă a ADN strâns corelat cu inflamația și rigiditatea arterială. Beneficiile hemodiafiltrării on-line în privința metilării ADN merită cercetate în continuare.

## CONCLUZII GENERALE

- Pacienții dializați au rigiditate arterială crescută comparativ cu populația generală
- Rigiditatea arterială a fost semnificativ mai puțin pronunțată la lotul HD comparativ cu lotul HDF independent de vârstă, vechimea în dializă și doza de dializă
- S-ar părea că rigiditatea arterială crescută la pacienții HD s-ar reflecta în statusul nutrițional precar, povara aterosclerotică și hipertensiunea arterială insuficient controlată
- La lotul HDF rigiditatea arterială a fost influențată de inflamație, hipertensiunea arterială și profilul lipidic
- S-ar putea să existe o legătură între rigiditatea arterială și performanța cardiacă explicată prin reducerea umplerii coronariene diastolice datorită creșterii rigidității arteriale și a hipertensiunii arteriale diastolice
- Rezultatele noastre sugerează că HDF ar putea avea un efect benefic asupra rigidității arteriale
- Pacienții tratați cu HD au prezentat hipermetilare ADN indiferent de gradul inflamației, cuantificat prin PCR, chiar și la pacienții fără sindrom inflamator sistemic
- Rigiditatea arterială este direct proporțională cu gradul metilării ADN
- La lotul HD s-a constatat hipermetilare a ADN comparativ cu HDF, nu doar la pacienții cu rigiditate arterială crescută ci și la pacienții cu PWV în limite normale

- 
- S-ar putea să existe o populație de pacienți dializați care au un grad ridicat de inflamație și de rigiditate arterială, pe baza hipermetilării ADN
  - Hemodializa high-flux pare să promoveze metilarea aberantă a ADN strâns corelat cu inflamația și rigiditatea arterială într-o măsură net superioară hemodiafiltrării online
  - Boala cardiovasculară în IRT este condiționată de un număr exhaustiv de factori de risc, listă la care ar putea fi adăugată și dereglarea mecanismelor epigenetice
  - Avantajele demonstrate în lucrarea de față ale hemodiafiltrării on-line în privința metilării ADN impun continuarea cercetării în studii viitoare

## **ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI**

Există un număr limitat de studii care să compare tehnicile de dializă din punctul de vedere factorilor de risc non-tradiționali precum rigiditatea arterială și metilarea ADN. În ultimii ani însă s-au strâns un număr important de dovezi ce susțin avantajele hemodiafiltrării online asupra supraviețuirii pacienților dializați, fără însă a fi investigate și explicate mecanismele. Aceste beneficii sunt evidente pentru hemodiafiltrarea online cu volume mari de substituție mai ales la pacienții la care coexistă: malnutriție, inflamație și rigiditate arterială.

Studiul nostru este credem primul din România care a comparat metilarea aberantă a ADN și rigiditatea arterială din prisma celor mai eficiente și mai utilizate metode de hemodializă: hemodiafiltrarea online post-diluție și hemodializa high-flux, aceasta din urmă considerată standardul de referință. Întru-cât nu am găsit în literatura de specialitate studii care să investigheze metilarea aberantă a ADN la pacienți tratați cu hemodiafiltrare online versus hemodializă high-flux, considerăm rezultatele noastre ca începutul cercetării pe acest subiect. Diferențele dintre hemodializa convențională și hemodiafiltrare sunt cunoscute și dovedite de numeroase studii clinice. Asocierile clinice dintre calitatea epurării toxinelor uremice și morbiditatea/mortalitatea cardiovasculară, de asemenea. Modificările gradului de metilare al ADN respectiv modificarea rigidității arteriale la pacienții dializați comparativ cu populația generală sunt binecunoscute.

Din cunoștințele noastre în lucrarea de față s-a demonstrat pentru prima oară în România existența unor diferențe semnificative de metilare aberantă a ADN la pacienți tratați cu hemodiafiltrare online față de hemodializa high-flux. Mai mult, hipermetilarea ADN s-a menținut la pacienții cu inflamație sistemică și rigiditate arterială crescute. Studiul nostru nu explică cauzele acestui exces de metilare ADN însă justifică și motivează continuarea demersului științific în studii ulterioare. Ar fi interesant de condus un studiu prospectiv, de lungă durată care să investigheze diferențele dintre metodele de hemodializă actuale. Acest studiu ar trebui să urmărească diferențele de morbiditate și mortalitate cardiovasculară prin intermediul rigidității arteriale și al gradului de metilare a ADN. S-ar impune stratificarea pacienților pe grupe de risc în funcție de inflamație, malnutriție, stres oxidativ și gradul de epurare al toxinelor uremice cu greutate moleculară medie.

# Arterial stiffness and aberrant DNA methylation in end-stage renal failure patients: hemodialysis versus hemodiafiltration

---

Doctoral candidate: **Adrian-Bogdan Ghigolea**

---

PhD supervisor: **Prof. Dr. Mirela Gherman-Căprioară**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

---

## TABLE OF CONTENTS

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>KEY WORDS</b>                                                          | 11 |
| <b>INTRODUCTION</b>                                                       | 11 |
| Study 1 – Arterial stiffness: hemodialysis versus hemodiafiltration       | 11 |
| Study 2 – Aberrant DNA methylation: hemodialysis versus hemodiafiltration | 14 |
| <b>GENERAL CONCLUSIONS</b>                                                | 16 |
| <b>THESIS ORIGINALITY AND INOVATIVE CONTRIBUTIONS</b>                     | 17 |

**KEY WORDS:** arterial stiffness, DNA methylation, hemodialysis, hemodiafiltration, end-stage renal failure, inflammation.

## INTRODUCTION

We aimed to evaluate arterial stiffness and DNA methylation, non-traditional mortality risk factors in end-stage renal failure patients, from the point of view of two hemodialysis techniques: high-flux hemodialysis and high substitution volume postdilution online hemodiafiltration.

### **Study 1. Arterial stiffness: hemodialysis versus hemodiafiltration**

Arterial stiffness represents the sum of pressional, biochemical, structural and mechanical modifications of the arterial wall. The consequences of arterial stiffening can be assessed by pulse wave analysis. Pulse wave properties are affected on one side by the aortic wall elasticity, distensibility and compliance and on the other side by the peripheral vascular resistance. The measure of these structural and functional changes are: the augmentation indexes and pulse wave velocity (PWV). The augmentation indexes reflect the effective arteriolar dilatation capacity and the peripheral vascular resistance. PWV is a precise marker of arterial wall rigidity and offers valuable information on its structure and function.

Arterial stiffness is one of the most important independent predictor of cardiovascular events in end-stage renal failure. Different treatment methods of ESRD have different effects on arterial stiffness parameters. The benefic role of high substitution volume online HDF on cardiovascular morbidity and mortality has recently been acknowledged. The role of HDF on arterial stiffness parameters is however limited and contradictories. From this point of view there are no studies to compare the effect of the most commonly used hemodialysis methods on arterial stiffness: online hemodiafiltration and high-flux hemodialysis. Under these circumstances we aimed to study the hypothesis that postdilution online hemodiafiltration treated patients would have better arterial stiffness parameters compared to high-flux hemodialysis treated patients. Our objective was to compare pulse wave velocity (PWV), augmentation indexes (Aix), pulse wave

return time (RT), diastolic reflection area (DRA) and to assess the contributors of arterial stiffness.

We conducted a twelve month, cross-sectional study, on forty-six non-diabetic dialysis patients equally divided to HD and HDF. Inclusion criteria were: age 18 to 80, thrice weekly four-hour dialysis sessions, stable for the last six months, blood flow of more than 250 mL/min; exclusion criteria: smokers, diabetics, active malignancy, acute infections, chronic viral B or C hepatitis, HIV, autoimmune disease, immunosuppressors, severe cardiac valve disease, auricular fibrillation. Dialysis was performed on Fresenius 4008S and 5008 dialysis machines using high-flux Helixone filters (FX 60, 80 or 100). A seven healthy subjects control group was formed. Study groups were compared using the t-Student test, the U Mann-Whitney or the X-squared test, as appropriate. For the correlation study, we used simple linear regression and stepwise multiple regression.

To our knowledge this is the first study which compared arterial stiffness differences between hemodialysis and hemodiafiltration treated patients. Arterial stiffness in dialysis patients is abnormally elevated compared to age and sex matched subjects. Our results confirmed that dialysis patients, both HD and HDF, have clearly higher arterial stiffness compared to the control group. Among dialysis patients, arterial stiffness parameters were significantly better in HDF compared to HD. If we would factor in the normal range for the analysis method we could argue that in HDF patients PWV was normal as opposed to elevated in HD patients, and AIx was elevated in HDF versus abnormally elevated in HD patients. In pathogenetic terms we found better aortic distensibility and a smaller increase in peripheral arterial resistance in HDF patients as opposed to HD patients which showed marked arterial stiffness and a severe increase of the peripheral arterial stiffness. Hence, the demonstrated excess of arterial stiffness in HD patients resulted both from the decreased arterial wall elasticity as evidenced by the high PWV and short TR, and from reduced arterial and arteriolar distensibility, as supported by the major increase of aortic and brachial augmentation indexes. The importance of our results are further highlighted by the fact that there were no statistical differences between the dialysis patient groups with regards to: age, sex, dialysis vintage, processed blood volume, blood flow or  $KT/V$ . Under these circumstances the difference in arterial stiffness could be explained by the superior clearance capacity of toxins on a broader spectrum of molecular weights through HDF versus HD.

Numerous studies have investigated the possibilities of improving outcomes in dialysis patients. Studies such as HEMO, MPO, CONTRAST, Ok et al, ESHOL, Canaud et al. highlighted the benefits of online HDF over conventional hemodialysis. As the increased arterial stiffness in dialysis patients is a major independent predictor of cardiovascular and global morbidity and mortality could lead us to assume that by improving arterial stiffness, online HDF would favorably influence the life expectancy of dialysis patients.

Systemic chronic inflammation increases the risk for cardiovascular events and the risk of death in hemodialysis patients. Inflammation was an important predictor of cardiovascular and global mortality in the RISCVID study. The same study though showed that despite inflammation online hemodiafiltration may increase survival, independently of

---

the dialysis dose, compared to conventional dialysis. Both dialysis patient groups in our study had increased levels of C-reactive protein and ferritin, in the absence of acute or chronic, clinically manifest, infection. One recent study recently demonstrated the ferritin levels associate to arterial stiffness progression, especially at levels  $>500$  ng/mL. Our results evidenced a strong positive correlation between ferritin and CRP. In multivariate analysis, however only ferritin remained an independent predictor of PWV in the HDF group ( $\beta = 0.45$ ;  $p = 0.018$ ;  $R^2\text{-adjusted} = 0.36$ ). These results suggest the existence of a negative effect of chronic inflammation on arterial stiffness, independently of other atherosclerosis related risk factors.

Hypoalbuminemia is one of the non-traditional risk factors with major impact on survival in chronic hemodialysis patients. In conventional hemodialysis treated patients the relative risk of death increases with hypoalbuminemia  $< 3,8$  g/dL. In our study, mean albumin levels neared the lower limit of the normal range:  $3.9 \pm 0.2$  g/dL for HD and  $3.8 \pm 0.3$  g/dL for HDF respectively. In the HD group we found a strong, negative correlation between albumin, PWV and RT. Further more, albumin was the sole independent predictor of PWV and RT in HD patients, its strong influence on arterial stiffness being sustained in multivariate analysis ( $\beta = -7.99$ ;  $p < 0.001$ ;  $F = 32.30$ ;  $R^2\text{-adjusted} = 0.59$ ). The pathogenetic link between arterial stiffness and hypoalbuminemia in dialysis patients could be mediated by increased oxidative stress and endothelial dysfunction. Studies such as the MPO study addressed this vast topic. It concentrated on the effects of HDF on survival in patients with low albumin and high mortality. The benefits of hemodiafiltration were only enhanced in this high risk group. In our study we must acknowledge that despite high CRP levels in both groups, there was no correlation between albumin and inflammation markers. Considering our own results and the literature we could presume that there would exist a definite benefit in switching hypoalbuminaemic, high arterial stiffness, high risk patients, from HD to HDF.

Arteriograph IrDA software measures and calculates several cardiac fitness markers like DRA; DRA is calculated on the pulse wave curve from the duration of the diastole and the difference between the theoretic and measured diastolic pressure curve, and offers informations on the quality of coronary artery diastolic filling. In our study we found a significant reduction of DRA in HD patients, compared to controls ( $p = 0.013$ ). If DRA reduction reflects diastolic cardiac perfusion reduction hence causing diastolic dysfunction then the relation with arterial stiffness encloses a well documented vicious circle. The reduction of DRA could therefore be the consequence of the excessive arterial stiffness specific for our HD group. By contrast, in HDF patients, DRA was higher with no difference compared to the control group, suggesting better diastolic coronary filling. In our HDF patients, HDL-cholesterol was the only strong independent predictor of DRA ( $\beta = 0.72$ ;  $p = 0.001$ ;  $F = 17.88$ ;  $R^2\text{-adjusted} = 0.70$ ). In HD patients diastolic BP independently predicted DRA in multivariate analysis. Our results could support the protective role for normal HDL-cholesterol and BP on diastolic coronary filling and therefore a possible favorable effect on cardiac function strongly related to arterial stiffness reduction.

The HDF patient group had better nutritional status compared to HD patients, as suggested by superior levels of: triglycerides, creatinine, transferrin saturation. Arterial

stiffness parameters in HD patients (PWV, RT, AIxAo and AIxBr) negatively strongly correlated to serum triglycerides and albumin levels. Serum triglyceride and HDL-cholesterol levels were independent predictors, in multivariate analysis, of the augmentation indexes.

In HDF patients brachial and aortic systolic blood pressures, and diastolic blood pressure showed a strong positive correlation, and were independent predictors of AIx. Although the augmentation indexes were elevated in HD patients as well, they did not correlate to blood pressure. If we take into account that most of the pressure decrease takes place in arterioles and small arteries, we could assume that the excessive increase in AIx of HD patients would denote peripheral vascular resistance increase and endothelial dysfunction. It is well documented that a higher dialysis dose results in better blood pressure control but the effects on arterial stiffness are contradictory. Our results suggest that better blood pressure control would have a beneficial effect on arterial stiffness in HDF treated patients.

Age is one of the most frequently factors associated to arterial stiffness. In our study, age independently predicted RT and dialysis vintage predicted, in univariate analysis, PWV and RT in HD patients, but they lost their significance in multiple regression.

The limitations of our study could be related to the cross-sectional design and the relative low subject count. Prospective randomized studies with appropriate follow up period are needed to clarify the contribution of the dialysis method to arterial stiffness.

As a conclusion HDF seems to offer a better arterial stiffness profile to chronic dialysis patients compared to high-flux HD patients. The benefits of HDF were independent of age, dialysis vintage, dialysis dose. It appears that the increase arterial stiffness in HD patients would reflect in their nutritional status and atherosclerotic burden. Additionally, a link between arterial stiffness and cardiac performance might exist as explained by diastolic cardiac filling decrease. Our results suggest that HDF could have an important beneficial effect on arterial stiffness.

## **Study 2. Aberrant DNA methylation: hemodialysis versus hemodiafiltration**

The most common epigenetic modification is DNA methylation, a process that generally has a repressive effect on gene expression. Aberrant DNA methylation was documented in ESRD patients: conventional and high-flux hemodialysis technique.

DNA methylation is under the influence of numerous factors such as age, sex, infection or nutrition. Newer uremia related factors added: inflammation, hyperhomocysteinemia, oxidative stress, vitamin deficiency. There are few studies of DNA methylation in dialysis patients and even fewer investigated the role of dialysis technique on DNA methylation. A simple Pub Med data base interrogation retrieved only 29 published papers on "DNA methylation" and "Dialysis". The most relevant of these papers proved contradictory indicating either hypomethylation or hypermethylation.

The commonest worldwide renal function substitution treatment is hemodialysis. Online hemodiafiltration however is a more efficient dialysis method with beneficial effects on cardiovascular survival. Based on this information and the lack of studies

---

comparing DNA methylation to different dialysis techniques, we aimed to investigate global DNA methylation from whole blood samples in patient treated by high-flux hemodialysis and postdilution online hemodiafiltration.

We conducted a cross-sectional, case-control study on eighty non-diabetic patients, on thrice weekly, four-hour dialysis sessions with a blood flow of at least 250 mL/min for at least six months. Exclusion criteria: age over 80 years, smokers, diabetes mellitus, active malignancy, autoimmune disease, immunosuppressors in use, chronic virus B, C or HIV infections, auricular fibrillation, advanced cardiac valve disease, aortic prosthetic. ESRD ethnology was: nephrosclerosis (n=47), ADPKD (n=13), glomerulonephritis (n=13) or obstructive uropathy (n=7). Vascular dialysis access consisted of: native arteriovenous fistula (n=71) or tunneled central venous catheter (n=9). The control group consisted of nine age matched normal weight, normal blood pressure subjects.

DNA analysis were performed on Zymo Research kits in the USAMV Laboratories from whole blood samples. A single arterial stiffness oscillometric measurement was performed using the Arteriograph IrDA (TensioMed, Budapest, Hungary). Groups were compared using the either the Student-t test, the Mann-Whitney U test (non-normal distribution) or the X-squared test. For the study of correlation, we resorted to simple linear and multiple stepwise regression: Pearson or Spearman, accordingly.

In our study, we found elevated global DNA methylation in all dialysis patients compared to controls. Most notably, global DNA methylation was significantly higher in high-flux hemodialysis patients compared to online HDF patients. DNA methylation distribution showed mostly hypermethylation in HD patients as opposed to hypomethylation in HDF patients.

We found a strong association between DNA methylation status and the dialysis method (both for HD and for HDF), high inflammation status, blood flow, processed blood volume, and iPTH. After quantifying these associations, we evidenced both a strong positive correlation between the DNA methylation status and the dialysis method, and strong negative correlations of DNA methylation with blood flow, processed blood volume. The dialysis method remained the sole predictor of DNA methylation status in multiple regression analysis, independent of: sex, age, dialysis vintage, vascular access, inflammation, blood flow, processed blood volume or Kt/V.

Inflammation is an important cardiovascular risk factor in dialysis patients whose correlations is to DNA hypermethylation has already been proven. Both dialysis patient groups had elevated CRP and ferritin levels. For a CRP value of at least 10 mg/L, DNA methylation was significantly lower in HDF compared to HD treated patients. High systemic inflammation defined as CRP level over 20 mg/L, positively correlated to HD independent of age, sex, dialysis vintage, blood flow, processed blood volume and Kt/V. We found the highest global DNA methylation level in the sub-group of “hyper-inflamed” HD patients. Dialysis method related differences were also evident in low inflammation patients. In this group global DNA methylation was higher in HD compared to HDF. Carracedo et al., showed that online HDF could reduce the production of pro-inflammatory cells and hence reduce inflammation maker levels compared to conventional HD. Aberrant DNA hypermethylation in dialysis patients could relate to a pro-inflammatory state

dependent on the dialysis method. In our study however, CRP inflammation maker lost its statistical significance in multivariate analysis.

Dialysis patients in our study showed increased arterial stiffness mostly due to increased augmentation indices (aortic and brachial) while PWV situated at the upper limit of the normal range for the method. Stratifying patients in function of a PWV threshold of 9,7 m/s we found similar results as for inflammation. DNA methylation was higher in HD compared to HDF patients for both high arterial stiffness and normal PWV. We noticed that all arterial stiffness parameters (PWV, AlxAo, AlxBr) correlated to age in HDF patients with no relation to dialysis dose parameters. On the contrary, in HD patients, PWV correlated to dialysis vintage and the augmentation indexes correlated to blood flow and the processed blood volume. In conclusion, we could assume that by increasing blood flow and / or the processed blood volume, we could favorably influence the augmentation indexes and hence reduce the burden of arterial stiffness. This could also be obtained by switching patients from HD to HDF treatment.

We acknowledge as limitations of our study the relative reduced number of subjects and the lack of prospective data for morbidity and mortality.

The survival of dialysis patients is under the influence of numerous risk factors to which we could add the deregulation of epigenetic mechanisms. It appears that a high risk population exists with increased inflammation and arterial stiffness based on DNA hypermethylation.

Our study is just a brief image of aberrant DNA methylation possible pathogenetic relations that would justify further research in prospective studies on bigger patient groups. Such studies could clarify the benefits of HDF compared to other renal function replacement therapies.

The present study is in our knowledge the first to investigate the influence of the dialysis technique on DNA methylation status. Hemodialysis seems to promote aberrant DNA methylation in close relation to inflammation and arterial stiffness. The benefits of online hemodiafiltration with regard to DNA methylation deserve further research.

## **GENERAL CONCLUSIONS**

- Dialysis patients have increased arterial stiffness compared to the general population
- Arterial stiffness was significantly less pronounced in HDF compared to HD patients, independent of age, dialysis vintage and the dialysis dose
- It appears that high arterial stiffness in HD patients would reflect their poor nutritional status, their atherosclerotic burden and inappropriate blood pressure control
- Arterial stiffness in HDF patients was dependent on inflammation, high blood pressure and dislydemia
- There might exist a link between arterial stiffness and cardiac performance explained by the reduction in diastolic coronarian filling due to arterial stiffness and high diastolic blood pressure
- Our results suggest a possible benefic effect of HDF on arterial stiffness

- 
- Patients on HD showed DNA hypermethylation indifferent of the degree of systemic inflammation, quantified by CRP levels, even in patients without increased systemic inflammation
  - Arterial stiffness is directly associated to the DNA methylation status
  - In HD patients, there was DNA hypermethylation compared to HDF patients, not only in the high arterial stiffness population but even in patients with normal PWV
  - There could exist a population of dialysis patients with high degrees of inflammation and arterial stiffness on the scaffold of DNA hypermethylation
  - High-flux hemodialysis seems to promote aberrant DNA methylation in close relation to inflammation and arterial stiffness in a notably superior fashion compared to HDF
  - Cardiovascular disease in ESRD is conditioned by a vast array of risk factors, to which epigenetic deregulation could be added
  - The advantages of online HDF that we demonstrate impose further research

## **THE ORIGINALITY AND THE INOVATIVE CONTRIBUTION OF THE THESIS**

There are a limited number of studies that compare different dialysis technique from the point of view of non-traditional risk factors such as arterial stiffness and DNA methylation. The last few years proved favorable in gathering data to support the benefits of online HDF on patient survival but without explaining the mechanism involved. These evident benefits of HDF are more evident in patients where malnutrition, inflammation and arterial stiffness.

We believe that this is the first study in Romania to compare aberrant DNA methylation and arterial stiffness from the dialysis methods: online post dilution HDF to the standard, high-flux hemodialysis

We found no studies that investigated aberrant DNA methylation in HDF versus high-flux HD. The differences between conventional HD and HDF are well documented. The clinical of uremic toxin clearance and cardiovascular morbidity/mortality also. Changes in the DNA methylation and arterial stiffness in dialysis patients compared to the general population are well established.

To our knowledge, in the present paper we first demonstrated, in Romania, the existence of significant differences of DNA methylation in HDF versus HD treated patients. Further more, DNA hypermethylation maintained in patients with high system and arterial stiffness. Our study does not explain the causes of DNA methylation and justifies the continuation the research. It would be interesting to run a prospective, long term study to compare the differences between the current dialysis methods. This study would monitor the differences in cardiovascular morbidity and mortality by the means of arterial stiffness and of the DNA methylation status. Patients would be stratified in risk sub-groups by inflammation, malnutrition, oxidative stress and uremic toxin clearance capacity.