

Procesy oksydacyjne oraz poziom siarki związanej i siarczanów w osoczu chorych w okresie predializacyjnym i poddawanych dializie otrzewnowej

W osoczu chorych ze schyłkową niewydolnością nerek (SNN) w okresie predializacyjnym (ND) oraz chorych poddawanych ciąglej ambulatoryjnej dializie otrzewnowej (CAPD) a także w grupie kontrolnej zostały przeprowadzone badania, które miały na celu ocenić i porównać 1) natężenie procesów oksydacyjnych przez pomiar dialdehydu malonowego (MDA) i karbonylacji białek, 2) poziom siarki sulfanowej „związanej” i siarczanów. Uzyskane wyniki wykazały, że u chorych ze SNN poddawanych CAPD w stosunku do chorych w okresie predializacyjnym (ND) obserwuje się mniejsze nasilenie stresu oksydacyjnego, jak również prawidłowe stężenie siarki sulfanowej „związanej”, co należy uznać za korzystny efekt działania terapeutycznego CAPD. Nie zaobserwowano natomiast różnic u chorych ND i poddawanych CAPD w stężeniu siarczanów.

(NEFROL. DIAL. POL. 2011, 15, 225-230)

Oxidative processes and the level of bound sulfur and sulfate in plasma of patients either in predialysis period or treated with peritoneal dialysis

The present studies were conducted in order to evaluate and compare: 1) intensity of oxidative processes by measuring malondialdehyde concentration and protein carbonylation level and 2) "bound" sulfane sulfur level and sulfate content in plasma of terminal renal failure (TRF) patients in predialysis period (ND), in patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and in control group. The obtained results demonstrated that TRF patients treated with CAPD showed oxidative stress of lesser intensity compared with ND patients and normal "bound" sulfane sulfur concentration which should be considered to be a beneficial effect of therapeutic action of CAPD. There were no differences in the concentration of sulfates between ND and CAPD patients.

(NEPHROL. DIAL. POL. 2011, 15, 225-230)

Wstęp

Stres oksydacyjny definiuje się jako zaburzenie fizjologicznej równowagi w komórkach pomiędzy antyoksydantami i prooksydantami. Schyłkowa niewydolność nerek (SNN) jest stanem patologicznym, któremu towarzyszy nadprodukcja wolnych rodników i pojawiający się stres oksydacyjny, co powoduje arteriosklerozę, przyspieszony proces starzenia się, polineuropatię, amyloidozę i inne schorzenia [16, 20, 28, 32, 37, 41]. Przyczyną nasilenia oksydacyjnych uszkodzeń obserwowanych u chorych ze SNN jest zarówno wadliwy metabolizm związany z procesem chorobowym jak i powtarzające się dializy. Do generowania reaktywnych form tlenu (RFT) jak i do powstawania substancji prozapalnych dochodzi u chorych hemodializowanych (HD) w wyniku bezpośredniego kontaktu krwi ze sztuczną błoną dializacyjną [16]. Z kolei u chorych poddawanych ciąglej ambulatoryjnej dializie otrzewnowej (CAPD) stres oksydacyjny jest spowodowany ograniczoną zgodnością biologiczną płynów dializacyjnych, czyli brakiem

kompatybilności. Wykazano, że kontakt błony otrzewnowej z płynem dializacyjnym o wysokiej osmolarności glukozy i niskim pH (mleczan) prowadzi do nasilonego tlenowego metabolizmu peryferyjnych fagocytów [43].

W literaturze istnieją przeciwstawne dane dotyczące natężenia stresu oksydacyjnego jaki występuje u chorych poddawanych terapii hemodializą (HD) oraz u chorych poddawanych ciąglej ambulatoryjnej dializie otrzewnowej (CAPD). Wprawdzie istnieją informacje wskazujące, że procesy oksydacyjne w obu przypadkach przebiegają na tym samym poziomie to jednak zdecydowana większość doniesień wskazuje na większe nasilenie stresu oksydacyjnego u chorych poddawanych HD [16,46].

W warunkach stresu oksydacyjnego powstające RFT mogą modyfikować makrocząsteczki takie jak: lipidy, kwasy nukleinowe i białka. Jednym z często występujących uszkodzeń w białkach jest powstawanie grup karbonylowych, spowodowane utlenieniem reszt aminokwasowych. Z kolei dialdehyd malonowy (MDA) jest drobnoczą-

Przemysław WŁODEK¹

Piotr KSIAŻEK²

Dorota KOWALCZYK-PACHEL³

Małgorzata ICIEK³

Bernadeta MARCYKIEWICZ¹

Małgorzata SULIGA⁴

Witold SMOLEŃSKI⁵

¹Centrum dializ Fresenius Nephrocare II, Szpital im. Rydygiera w Krakowie

²Katedra i Zakład Zdrowia Publicznego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

³Katedra Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie

⁴Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolęcznictwa w Krakowie

⁵Oddział Urologii WSS L. Rydygiera w Krakowie

Słowa kluczowe:

- dializa otrzewnowa
- przemiany cysteiny
- stres oksydacyjny
- tiole

Key words:

- peritoneal dialysis
- cysteine metabolism
- oxidative stress
- thiols

Adres do korespondencji:

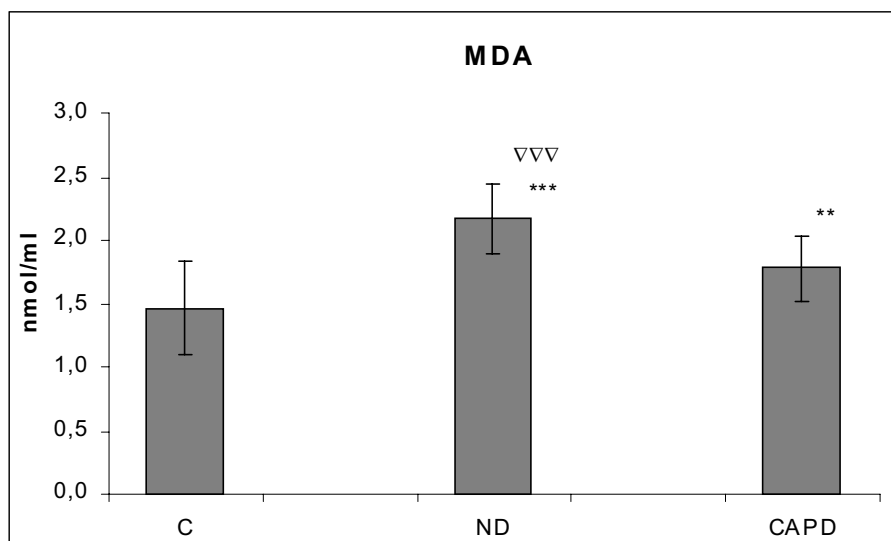
Danuta Kowalczyk-Pachel
ul. Kopernika 7; 31-034 Kraków; Polska
tel. 12 422 74 00, fax: 12 422 32 72
e-mail: dkowalczyk@cm-uj.krakow.pl

steczkowym aldehydem powstającym w wyniku ataku reaktywnych form tlenu (RFT) na nienasycone kwasy tłuszczowe. Zarówno nasilenie karbonylacji białek jak i wzrost poziomu MDA stanowią biologiczne wskaźniki stresu oksydacyjnego.

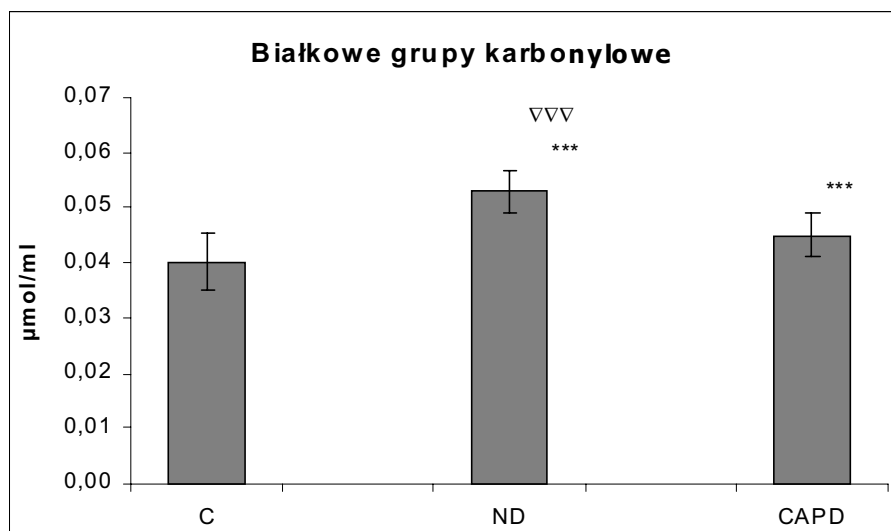
U chorych ze SNN oprócz nasilenia procesów oksydacyjnych i powstawania prooksydacyjnych toksyn mocznicowych obserwuje się również zaburzony profil aminokwasowy w komórkach i w osoczu. Jest to spowodowane dietą niskobiałkową oraz zakłóconym katabolizmem białek i aminokwasów [5, 10], a także zaburzonym transportem między narządowym [14, 48]. W uremii całkowita ilość wszystkich aminokwasów osocza w porównaniu do osób zdrowych jest najczęściej podwyższona. Jednak tylko w przypadku aminokwasów siarkowych t.j. cysteiny i homocysteiny zmiany te są szczególnie wysokie co w konsekwencji może prowadzić do zaburzeń w potencjale redok-sowym osocza [2].

Metabolizm siarki cysteiny może być tlenowy tzn. prowadzący do siarczanów i tauryny, w którym atom siarki przyjmuje najwyższy (+6) stopień utlenienia. Równocześnie przebiega metabolizm beztlenowy prowadzący do biosyntezy zredukowanej siarki sulfanowej występującej na 0 lub -1 stopniu utlenienia i zawsze związanej z innym atomem siarki (schemat 1) [18, 44]. Na szczególne zwrócenie uwagi zarówno wśród nefrologów jak i biochemików zasługuje fakt, że cechą charakterystyczną nerek w warunkach fizjologicznych jest: 1) najwyższe stężenie cysteiny [1], 2) najwyższe stężenia siarki sulfanowej [35], jak również 3) najwyższą aktywność γ -glutamylotranspeptydazy [17], enzymu odpowiedzialnego za metabolizm glutationu i poziom cysteiny w komórkach. Wskazuje to, że nerki pełnią niezwykle i nie zawsze dostatecznie podkreślaną i wyjaśnioną rolę w metabolizmie siarki cysteiny. Powyższe informacje, jakkolwiek są w pełni udokumentowane to jednak wciąż do końca nieznaną są tego przyczyny jak i skutki. Stanowiło to dla nas inspirację do równoczesnego podjęcia oznaczeń poziomu jednej z frakcji siarki sulfanowej, tzw. „związanej”, czyli tej jej części, która może modyfikować grupy -SH białek osocza (głównie albuminy) do wodoronadsiarczków (B-S-SH) [36]. Tego rodzaju kowalencyjna modyfikacja grup -SH białek zwiększa moc antyoksydacyjną, jak również umożliwia z udziałem albuminy transport siarki sulfanowej do różnych tkanek i narządów, a także detoksykację cyjanku. Dlatego wydawało się nam niezwykle interesującym podjęcie badań mających na celu wykazać jak na tle oksydacyjnych uszkodzeń zmienia się również poziom siarki „związanej” oraz jaki wpływ na jej poziom będzie miała dializa otrzewnowa.

W przedstawionej pracy w osoczu chorych ze SNN w okresie predializacyjnym (ND), oraz w grupie chorych poddawanych CAPD, a także w grupie kontrolnej (zdrowej) przeprowadzono ocenę intensywności stresu oksydacyjnego poprzez pomiar stężenia MDA i nasilenia karbonylacji białek. Równocześnie w osoczu przeprowadzono oznaczenia stężenia siarki „związanej” (B-S-S⁻H) oraz siarczanów (SO₄²⁻). Zatem celem przeprowadzonych badań było po-



Rycina 1
Poziom produktów peroksydacji lipidów (MDA) w osoczu osób zdrowych (C) oraz chorych ze schyłkową niewydolnością nerek w okresie predializacyjnym (ND) i dializowanych otrzewnowo (CAPD)
p < 0,01; *p < 0,001 w porównaniu z kontrolą; ∇∇∇p < 0,001 porównując CAPD z ND
The level of malondialdehyde (MDA) in plasma nondialysed (ND) and CAPD patients.
p < 0,01; *p < 0,001 compared with control subjects
∇∇∇p < 0,001 nondialysed (ND) compared with peritoneal dialysis (CAPD)



Rycina 2
Poziom białkowych grup karbonylowych w osoczu osób zdrowych (C) oraz chorych ze schyłkową niewydolnością nerek w okresie predializacyjnym (ND) i dializowanych otrzewnowo (CAPD)
***p < 0,001 w porównaniu z kontrolą; ∇∇∇p < 0,001 porównując CAPD z ND
The level of protein carbonyl groups in plasma nondialysed (ND) and CAPD patients.
***p < 0,001 compared with control subjects; ∇∇∇p < 0,001 nondialysed (ND) compared with peritoneal dialysis (CAPD)

Tabela I

Główne parametry w grupie kontrolnej oraz w grupie chorych ze schyłkową niewydolnością nerek niedializowanych (ND) oraz w grupie poddawanej dializie otrzewnowej (CAPD ESRF).
General parameters in control, nondialysed chronic kidney disease (ND CKD) and continuous ambulatory peritoneal dialysis end-stage renal failure (CAPD ESRF) patients.

Parametry	Controls (n=33)	ND CKD (n=33)	CAPD ESRF (n=33)
Wiek (lata)	57,67±9,61 (42-84)	65,11±9,70 (38-80)	59,61±15,03 (26-84)
Płeć (kobiety/mężczyźni)	14/19	15/18	18/15
Białko całkowite (g/L)	69,25±4,69	73,14±5,14	66,12±5,13
Kreatynina (mmol/L)	73,85±10,0	194,58±98,82	642,27±185,74
eGFR (mL/min)	91,30±15,75	35,45±16,02	5,6±3,4

znanie i porównanie wpływu na wszystkie powyższe parametry, schyłkowej niewydolności nerek (SNN) u chorych w okresie predializacyjnym (ND) oraz u chorych poddawanych terapii CAPD.

Materiały i metody

Chorzy i grupa kontrolna

Krew pochodziła od pacjentów Szpitala im. Rydygiera (Nephro Fresenius Care II) w Krakowie. Badania zostały przeprowadzone w trzech grupach: w grupie 1 znajdowało się 33 chorych z TNN niedializowanych (ND) (15 kobiet i 18 mężczyzn); grupę 2 stanowiło 33 chorych z TNN poddawanych CAPD (18 kobiet i 15 mężczyzn); grupę 3 (kontrolną) stanowiły 33 osoby zdrowe (14 kobiet i 19 mężczyzn). Grupa kontrolna była symetryczna w stosunku do grup badanych względem wieku i płci i stanowili ją pracownicy szpitala, Katedry Biochemii, Stacji Krwiodawstwa oraz znajomi. Były to osoby zdrowe, nie poddawane żadnej terapii farmakologicznej, a ocena funkcji nerek polegała na oznaczaniu: filtracji kłębkowej (GFR) i poziomu kreatyniny. Zarówno w przypadku osób chorych, jak i w grupie kontrolnej (zdrowej), zostały przeprowadzone następujące oznaczenia: białka całkowitego, kreatyniny, oraz eGFR. Kliniczna i demograficzna charakterystyka osób chorych i zdrowych została zamieszczona w tabeli I.

Przyczynami schyłkowej niewydolności nerek (SNN) zarówno w grupie chorych ND jak i poddawanych CAPD było: przewlekłe odmiedniczkowe zapalenie nerek, zwrodnienie wielotorbielowa nerek, nefropatia cukrzycowa, kamica nerkowa, nefropatia nadciśnieniowa.

Kryteriami wyłączenia były: choroby nowotworowe (aktualne i przebyte), niestabilność hemodynamiczna, stany zapalne, choroby wątroby, niedożywienie, palenie papierosów, alkohol, niedobory immunologiczne. Wszyscy chorzy aktualnie nie byli poddawani terapii kwasem foliowym.

Grupa chorych ND z zaawansowanym uszkodzeniem nerek będąca przed inicjacją terapii nerkozastępczej była poddawana terapii zachowawczej. Wskaźnik filtracji kłębkowej (GFR) był mniejszy od 60 ml/min. Chorzy ND pozostawali na diecie ograniczającej białko do 0.8-1.0 g/kg na dobę oraz z ograniczeniem fosforanów.

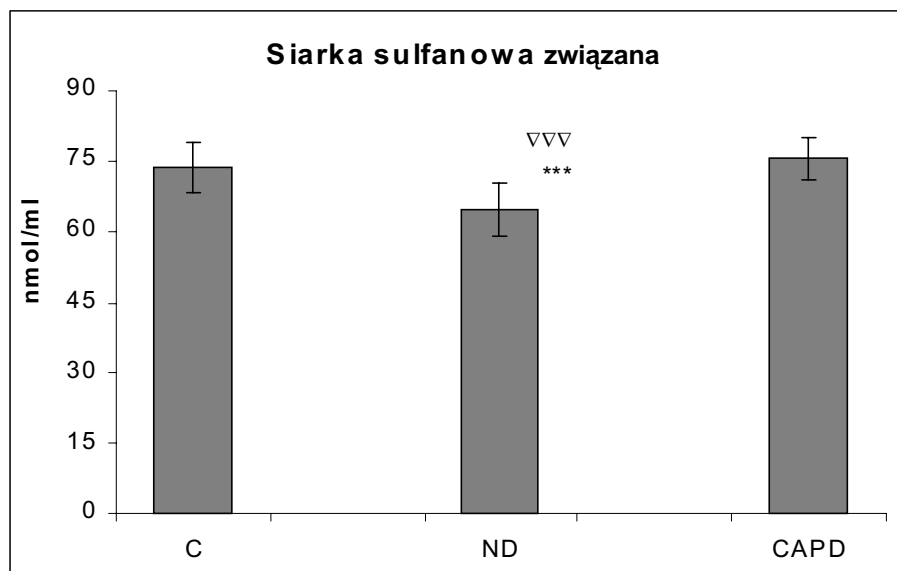
W grupie chorych poddawanych CAPD stosowano dziennie 4 zmiany dializy otrzewnowej, a wszyscy chorzy aktualnie nie wykazali zapalenia otrzewnej, pozostawali na diecie bogato białkowej (1.2 kg/kg/dobę) z ograniczeniem fosforanów. Stosowany płyn dializujący zawierał glukozę i pochodził z Fresenius Medical Care, GmbH 66606 St. Wandel, Niemcy.

Do leków, które przyjmowali chorzy w obu badanych grupach należą: β -blokery, clonidyna, furosemid, węglan wapnia i inhibitory ACE.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Krakowie.

Pobieranie krwi

Krew chorych ND i poddawanych CAPD oraz w grupie kontrolnej pobierano na czczo między 8 a 9 rano do próbek zawierających EDTA umieszczonych w łaźni lodowej, a następnie wirowana przy 250 g przez 10 minut. Czas od momentu pobrania krwi poprzez wirowanie do uzyskania oso-

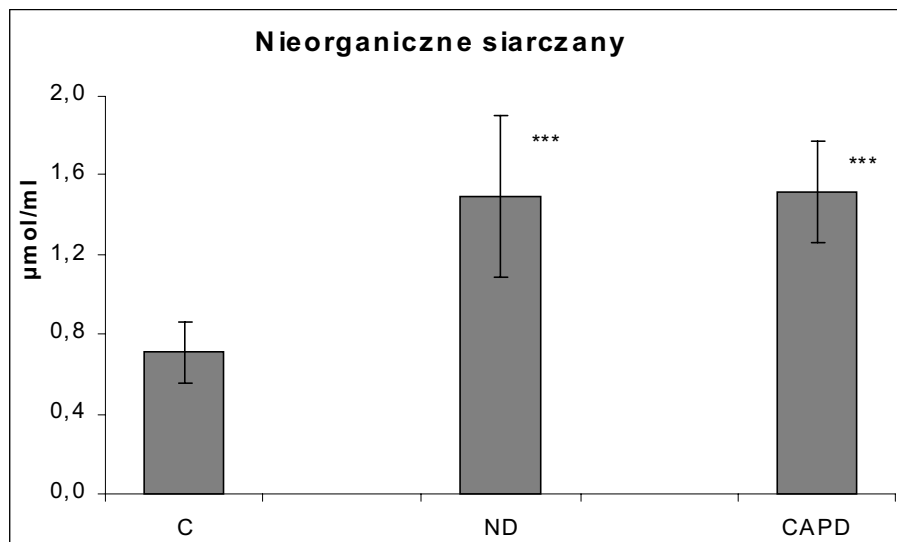


Rycina 3

Poziom siarki sulfanowej związanej w osoczu osób zdrowych (C) oraz chorych ze schyłkową niewydolnością nerek w okresie predializacyjnym (ND) i dializowanych otrzewnowo (CAPD). ***p < 0,001 w porównaniu z kontrolą; ▽▽▽p < 0,001 porównując CAPD z ND

The level of bound sulfane sulfur in plasma nondialysed (ND) and CAPD patients.

***p < 0,001 compared with control subjects; ▽▽▽p < 0,001 nondialysed (ND) compared with peritoneal dialysis (CAPD)



Rycina 4

Poziom nieorganicznych siarczanów w osoczu osób zdrowych (C) oraz chorych ze schyłkową niewydolnością nerek w okresie predializacyjnym (ND) i dializowanych otrzewnowo (CAPD). ***p < 0,001 w porównaniu z kontrolą

The level of nonorganic sulphate in plasma nondialysed (ND) and CAPD patients. ***p < 0,001 compared with control subjects

cza nigdy nie przekraczał 30 minut. Uzyskane osocze natychmiast zamrażano w temperaturze -80°C.

Odczynniki

Kwas trichlorooctowy (TCA), kwas tiobarbiturowy (TBA), 2,4-dinitrofenylohydrazynę (DNPH), DL-ditiotreitol (DTT), p-fenylenodiaminę (pfa) zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich (St. Louis MD, USA). Pozostałe odczynniki kupiono w firmie Chempur (Polska) lub POCH (Polska).

Oznaczenia

Wynik każdego pojedynczego oznaczenia stanowi średnią trzech powtórzeń a ilości badanych osób w poszczególnych grupach umieszczono w Materiałach i Metodach.

Oznaczenie poziomu siarki związanej w osoczu

Oznaczenie to jest modyfikacją metody Ogasawary [36]. „Siarką związaną” nazwał on siarkę uwalnianą przez redukcję ditiotreitolem (DTT). Powstałe w ten sposób jony siarczkowe są przekształcane w reakcji z p-fenylenodiaminą i jonami żelaza Fe³⁺ we fluoryzującą pochodną tioninę. Fluorescencję powstałego związku mierzy się przy długości fal: λ_{ex} =600 nm, λ_{em} =623 nm.

Wykonanie oznaczenia dla osocza: Do 125 μ l osocza dodano 125 μ l 50 mM buforu boranowego pH=9,0 oraz 250 μ l 20 mM DTT. Mieszaninę inkubowano przez 10 minut w temp. 37°C. Następnie dodano do niej 10 μ l 0,1 M NaOH, 400 μ l

12,5 mM p-fenylenodiaminy (pfda) i 100 μ l 40 mM FeCl₃ w 6 M HCl. Mieszaninę ponownie inkubowano przez 10 min. W temp. pokojowej, wirowano przez 5 min. w 13 400 g. Pomiar wykonano na fluorymetrze Aex=600 nm, Aem=623 nm.

Oznaczenia stężenia produktów peroksydacji lipidów (MDA) w osoczu

Metoda oparta jest na reakcji aldehydu malonowego (MDA) z kwasem tiobarbiturowym.

W wyniku reakcji pomiędzy kwasem tiobarbiturowym i niektórymi produktami peroksydacji lipidów, w środowisku kwasowym w podwyższonej temperaturze, powstaje barwny addukt mający różowe zabarwienie i jego stężenie może być oznaczanie na podstawie pochłaniania światła lub fluorescencji [4].

Wykonanie oznaczenia: Do 250 μ l osocza dodawano 500 μ l 15% TCA i 500 μ l 0,37% TBA. Próbkę inkubowano 10 minut w temp. 100°C, następnie schładzano, wirowano przez 10 minut przy 13 400 g i mierzono absorbancję przy długości fali λ =535 nm.

Oznaczenie poziomu grup karbonylowych w białkach osocza

Oznaczenie opiera się na metodzie Reznicka i Packera [39], w której 2,4-dinitrofenylohydrazyna reaguje z grupami karbonylowymi białek. Powstające 2,4-dinitrofenylohydrazony mają charakterystyczne żółte zabarwienie i ich stężenie może być oznaczane kolorymetrycznie.

Wykonanie oznaczenia: Do 100 μ l osocza dodawano 1 ml 10 mM 2,4-dinitrofenylohydrazyny (DNPH) i inkubowano 1 godzinę w temperaturze pokojowej co jakiś czas mieszając. Następnie do próbki dodawano 1 ml zimnego 20% TCA i wytrącony osad wirowano przez 10 minut przy 13 400 g. Supernatant odrzucono, a osad przemywano trzykrotnie roztworem etanol:octan etylu zmieszanych w stosunku 1:1. Po przemyciu osadu dodawano 1 ml 6 M mocznika w celu rozpuszczenia osadu. Mierzono absorbancję roztworu przy długości fali λ =370 nm.

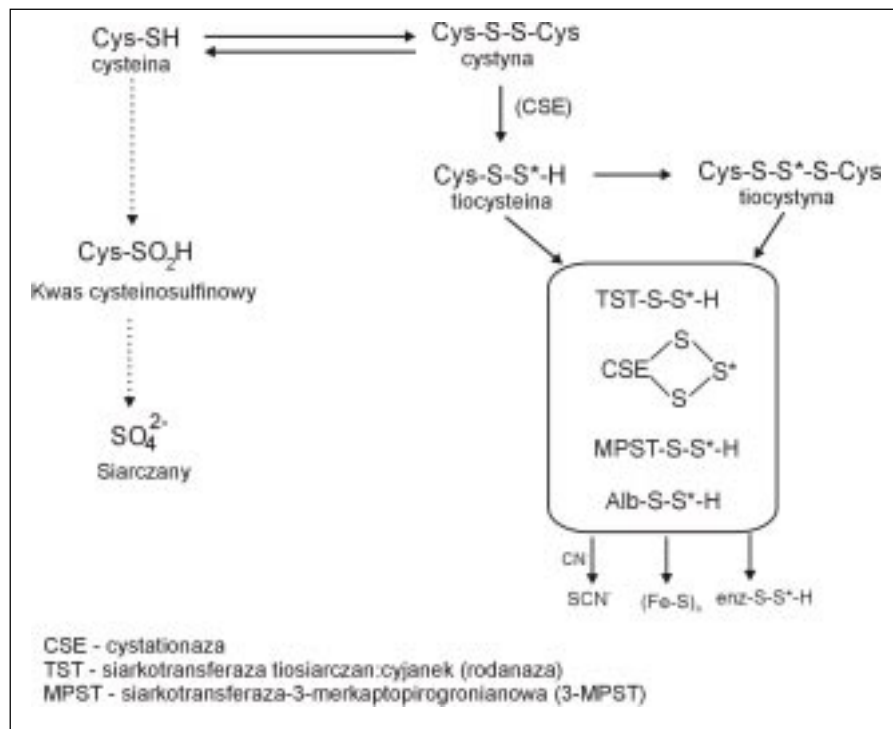
Oznaczenie białka całkowitego w osoczu

Metoda jest oparta na reakcji wiązań peptydowych oraz występujących w białku reszt aminokwasów aromatycznych (tyrozyny i tryptofanu) z odczynnikiem Folina i Ciocalieu'a, który jest mieszaniną kwasu fosforowolframowego i fosfomolibdemowego. Reakcja ta zachodzi w środowisku zasadowym w obecności jonów miedziowych. Białka związane z jonem miedzi redukują oba powyższe kwasy do ich tlenków [22].

Wykonanie oznaczenia: Mieszaninę reakcyjną złożoną ze 100 ml 50-krotnie rozcieńczonego 0,1 M buforem fosforanowym o pH=7,4 osocza, 100 ml 1 M NaOH i 1 ml odczynnika miedziowego (tj. 9,8 ml 2% Na₂CO₃ + 100 ml 2% winianu sodowo-potasowego + 100 ml 1% CuSO₄) inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie dodawano 100 ml odczynnika Folina-Ciocalieu i wytrząsano. Po upływie 30 minut od dodania tego odczynnika mierzono absorbancję przy długości fali λ =500 nm.

Oznaczenie poziomu nieorganicznych siarczanów w osoczu metodą zmętnieniową

Stężenie nieorganicznych siarczanów zostało oznaczone metodą *Dodgsona* [8]. Metoda ta wykorzystuje reakcję jonów SO₄²⁻ obecnych w osoczu z chlorkiem baru. Powstały osad siarczanu(VI) baru zostaje zawieszony na żelatynie. Miarą zmętnienia jest ilość powstałego osadu BaSO₄. Zmętnienie roztworu mierzono przy 450 nm



Schemat 1

Tlenowe i beztlenowe przemiany cysteiny Aerobic and anaerobic cysteine metabolism

z cy z chlorkiem baru. Powstały osad siarczanu(VI) baru zostaje zawieszony na żelatynie. Miarą zmętnienia jest ilość powstałego osadu BaSO₄. Zmętnienie roztworu mierzono przy 450 nm

Roztwór żelatynowy (0,1 g na 20 ml wody) przygotowano przeddzień oznaczenia i przechowano w +4°C. 0,1 g BaCl₂ rozpuszczono w roztworze żelatynowy na 2-3 godziny przed oznaczeniem. Do 0,95 ml osocza dodano w celu odbiałczania 0,05 ml 50% TCA i wirowano przy 13 400 g przez 10 min. 0,5 ml odbiałczonego osocza dodano do 0,5 ml roztworu BaCl₂ w żelatynie. Absorbancję mierzono przy λ =450 nm po 20 minutach.

Oznaczenia kreatyniny i eGFR zostały wykonane w Laboratorium Analitycznym Szpitala im. Rydygiera w Krakowie.

Wyniki

Zarówno poziom MDA jak i natężenie procesu karbonylacji białek są podwyższone w grupie chorych ze SNN niedializowanych (ND). Natomiast w grupie chorych poddawanych terapii CAPD wprawdzie utrzymują się na podwyższonym poziomie, to jednak zdecydowanie niższym niż w grupie chorych niedializowanych (ND) (rycina 1 i 2). Z kolei poziom zredukowanej siarki „związanej” jest obniżony w grupie chorych ND, podczas gdy u chorych poddawanych CAPD utrzymuje się na poziomie kontrolnym (rycina 3). Natomiast stężenie nieograniczonych siarczanów (SO₄²⁻) zarówno w osoczu chorych niedializowanych (ND) jak i poddawanych CAPD jest w takim samym stopniu podwyższone (t.j. około dwukrotnie) w stosunku do kontroli (rycina 4).

Zakres poziomu MDA w osoczu podawany w literaturze dla grupy kontrolnej waha się w granicach od 1,4 nmol/mL do 2,69 nmol/mL [19,30]. Poziom MDA w grupie kontrolnej oznaczony w tej pracy wynosi

1,47 nmol/mL, czyli mieści się w tych granicach. Stężenie grup karbonylowych oznaczone w przedstawionej pracy wynosi (0,04 μ mol/mL co odpowiada 0,6 nmol/mg białka) czyli również mieści się w zakresie wartości publikowanych przez innych autorów, który wynosi od 0,16 nmol/mg białka do 1,33 nmol/mg białka [6, 33]. Aktualnie oznaczony przez nas poziom grup karbonylowych całkowicie pokrywa się z poziomem opublikowanym przez *Erdogana* [11].

Dyskusja

Wszystkie dotychczasowe badania wskazują, że schyłkowa niewydolność nerek (SNN) jest stanem patologicznym któremu towarzyszy nasilenie stresu oksydacyjnego [37, 47, 49, 53]. U chorych ze SNN następuje w osoczu spadek poziomu antyoksydantów, z równoczesnym wzrostem reaktywnych aldehydów - produktów peroksydacji lipidów oraz postępującym procesem utleniania białek.

Wyniki badań uzyskane w tej pracy potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że już u chorych w okresie predializacyjnym (ND) w stosunku do grupy kontrolnej następuje nasilenie procesów prooksydacyjnych, czego miarą jest wzrost poziomu zarówno aldehydu malonowego (MDA) (rycina 1) jak i natężenia karbonylacji białek (rycina 2) [53]. Oznacza to, że zmiany oksydacyjne w osoczu chorych ze SNN pojawiają się już przed przejściem na leczenie dializami. Natomiast w osoczu chorych poddawanych CAPD w stosunku do chorych ND obserwuje się zarówno niższe stężenia MDA (rycina 1) jak i mniejsze natężenie karbonylacji białek (rycina 2). Niższy poziom MDA u chorych poddawanych CAPD w stosunku do chorych niedializowanych może być wynikiem zarówno zahamowania peroksydacji lipidów, jak i efektem usuwania z osocza podczas diali-

zy otrzewnowej. Z tego powodu karbonylacja białek wydaje się być bardziej wiarygodnym biomarkerem oksydacji, ponieważ lepiej odzwierciedla rozmiar stresu oksydacyjnego, a obserwowane zmiany w białkach są trwałe i pojawiają się w osoczu wcześniej od obserwowanych zmian w stężeniu MDA. Pod pojęciem „grupy karbonylowe białek” rozumie się grupy karbonylowe (-CO) reagujące z 2,4-dinitrofenylohydrazyną (DNPH) [12], podczas gdy grupy -CO wiązań peptydowych nie dają takiej reakcji. Karbonylacja białek prowadzi do zmian konformacyjnych, których konsekwencją jest utrata biologicznych właściwości [3]. Grupy karbonylowe mogą powstawać w białkach w warunkach stresu oksydacyjnego w wyniku bezpośredniego utleniania pod wpływem RFT reszt aminokwasowych. Może to również następować pośrednio, kiedy RFT najpierw utleniają lipidy i węglowodany z powstaniem związków karbonylowych, które następnie tworzą addukty z białkami. Dlatego trudno jest ocenić w jakim stopniu karbonylacja białek jest następstwem gliko- lub lipooksydacji, a w jakim stopniu jest wynikiem bezpośredniej oksydacji reszt aminokwasowych w białkach. Dlatego proces karbonylacji białek należy traktować jako marker procesów oksydacyjnych rozumiany w szerokim zakresie [3,39].

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że u chorych ze SNN poddawanych CAPD w stosunku do chorych ND obserwuje się mniejsze nasilenie stresu oksydacyjnego, co należy uznać za korzystny efekt terapeutycznego działania dializy otrzewnowej.

Z kolei mniejsze natężenie stresu oksydacyjnego przy zastosowaniu dializy otrzewnowej (CAPD) w porównaniu do hemodializy (HD) może być wynikiem wolniejszego spadku resztkowej funkcji nerek [3], oraz faktu, że u chorych poddawanych CAPD (w przeciwieństwie do chorych hemodializowanych) nie obserwuje się nasilonej apoptozy leukocytów (PBML) [13]. Dodatkowo eryocyty chorych poddawanych CAPD nie są narażone na kontakt ze sztuczną błoną dializacyjną i dlatego wykazują dłuższy czas życia [23]. Zauważono również, że LDL chorych poddawanych CAPD jest bardziej odporne na utlenianie w stosunku do LDL chorych poddawanych HD [25]. Ponadto u chorych poddawanych CAPD wprawdzie utrzymuje się prowadząca do stresu oksydacyjnego hyperhomocysteinemia to jednak całkowite stężenie tego aminokwasu jest niższe niż w przypadku stosowania HD [29].

Obserwowane uremiczne syndromy towarzyszące SNN są wynikiem postępującej akumulacji szerokiego spektrum toksyn będących produktami zakłóconego metabolizmu oraz wydalania. Wszystkie toksyny uremiczne u chorych ze SNN są usuwane z organizmu podczas nerkozastępczej terapii dializą otrzewnową (CAPD) lub hemodializą (HD). W przypadku stosowania CAPD istnieje ciągłość procesu dializacyjnego, co zapobiega nadmiernej akumulacji toksyn w osoczu. Natomiast u chorych poddawanych HD w okresie pomiędzy dializami (48 godzin) dochodzi do okresowego, nadmiernego gromadzenia się w wysokich stężeniach toksyn uremicznych, a także substancji o toksycznym działaniu oksydacyjnym.

Przeprowadzone badania wykazały następnie, że stężenie siarki „związanej” z białkami osocza u chorych poddawanych CAPD utrzymuje się na poziomie kontrolnym, (rycina 3), co również można uznać za korzystne działanie dializy otrzewnowej. Natomiast u chorych w okresie predializacyjnym (ND) poziom siarki „związanej” jest obniżony co z kolei może świadczyć o zahamowaniu jej biosyntezy pod wpływem gromadzących się toksyn mocznicowych. Prawidłowy poziom siarki sulfanowej w osoczu i w komórkach jest istotny ze względu na właściwości regulacyjne [18, 44] i antyoksydacyjne [12] a także możliwość transportu do różnych narządów [45]. Siarka sulfanowa jest również istotna w przypadku chorych ze SNN ze względu na jej możliwość skutecznej detoksykacji cyjanku, którego wzrost stężenia obserwuje się w erytrocytach chorych ze SNN [15]. Ponadto siarka „związana” z białkami jest bezpośrednim prekursorem siarkowodoru (H_2S), trzeciego gazu, oprócz tlenu azotu (NO) i tlenu węgla (CO), wykazującego wazorelaksacyjne działanie [6]. Obniżony poziom H_2S był obserwowany u chorych poddawanych hemodializie [35].

Prawidłowy poziom w osoczu siarki „związanej” zaobserwowany u chorych poddawanych CAPD jest cenną obserwacją ponieważ problem korygowania w organizmie zaburzonych stężeń siarki sulfanowej, (a w konsekwencji stężenia H_2S) ze względu na ogromną niestabilność i reaktywność tych połączeń jest sprawą niezwykle trudną. Trudności w podawaniu prekursorów siarki sulfanowej w celach terapeutycznych wiążą się z tym że, prekursor siarki sulfanowej w zależności od uzyskanego stężenia w komórkach mogą wykazywać zarówno działanie antyoksydacyjne [26] jak i prooksydacyjne [31].

Nasze poprzednie badania wykazały, że całkowite stężenie siarki sulfanowej w osoczu (oznaczone reakcją cyjanolizy) było u chorych ND podwyższone względem kontroli, natomiast obniżone u chorych poddawanych CAPD [51]. Podczas gdy oznaczenia przeprowadzone w tej pracy wykazały, że część siarki sulfanowej tzw. „związana” u chorych poddawanych CAPD utrzymuje się na poziomie kontrolnym. Oznacza to, że w warunkach patologicznych poszczególne frakcje siarki sulfanowej mogą zmieniać swoje stężenia w odmienny sposób. Przyczyną tego może być również fakt, że w grupie ND w wyniku większego natężenia procesów oksydacyjnych następuje spadek ilość wolnych grup -SH białek osocza (nośników siarki „związanej”), w wyniku odwracalnego utleniania do disiarczków lub nieodwracalnego do SO_3H . Obniżony poziom siarki „związanej” u chorych ND może być również efektem jej udziału w reakcjach antyoksydacyjnych związanych z nasilonym stresem oksydacyjnym [12].

Z kolei nieorganiczne siarczany (SO_4^{2-}) są ważnymi anionami biorącymi udział w metabolizmie wielu połączeń [52], a z organizmu są usuwane z moczem w niezmiennym postaci. Poziom siarczanów w osoczu zależy od ilości białka w diecie i odzwierciedla narastanie kwasicy metabolicznej typowej dla SNN. Podwyższony poziom siarczanów (SO_4^{2-}) w osoczu chorych ze SNN jest efektem obniżonego wskaźnika filtracji kłębuszkowej i dlatego nie odzwierciedla natężenia tlenowych przemian siarki. Jakkolwiek

fakt, że w literaturze istnieją doniesienia o wzroście stężenia u chorych ze SNN prekursora siarczanów, tj. kwasu cysteinosulfanowego ($C-SO_2H$) może sugerować że przyczyną podwyższonego stężenia SO_4^{2-} (niezależnie od utrudnionego wydalania) może być również nasilenie tlenowego katabolizmu cysteiny. Natomiast przeprowadzone w tej pracy w grupie kontrolnej (zdrowej) równoczesne oznaczenie siarki „związanej” i siarczanów pozwala ocenić jak w fizjologicznych warunkach przedstawia się w osoczu stosunek siarki „związanej” do siarczanów co odzwierciedla natężenie tlenowych i beztlenowych przemian cysteiny, czym poszerza biochemiczną wiedzę o metabolizmie siarki u człowieka.

W przypadku siarczanów na uwagę zasługuje obserwacja wykazująca, że zarówno w osoczu chorych ND jak i poddawanych CAPD obserwuje się taki sam wzrost stężenia siarczanów (dwukrotnie wyższy w stosunku do kontroli) (rycina 4). U chorych ze SNN poddawanych hemodializie w odróżnieniu od poddawanych CAPD poziom siarczanów przed każdą kolejną hemodializą może wzrastać nawet od 5 do 10 razy i po każdej hemodializie nadal utrzymuje się na podwyższonym poziomie [26]. Oznacza to, że ze względu na ciągłość procesu u chorych poddawanych CAPD zmiany w stężeniach SO_4^{2-} nie są tak drastyczne i utrzymują się u chorych na stałym, dwukrotnie podwyższonym poziomie.

Kliniczne konsekwencje hipersulfatemii u chorych ze SNN nie są do końca znane. Siarczany nie są wprawdzie uważane za „toksyczne uremiczną”, to jednak wciąż problem ten pozostaje obiektem kontrowersji [42]. Chroniczna hipersulfatemia może wywoływać u chorych ze SNN nieprawidłowy metabolizm wapnia co prowadzi do patogenezy osteodystrofii nerek. Potwierdzają to obserwacje wzrostu wydalania wapnia przy wzroście zewnątrzkomórkowego stężenia siarczanów [26, 27]. Zatem hipersulfatemia może indukować hipokalcemię, a w ten sposób indukować wtórną nadczynność przytarczyc [26]. Dlatego skuteczne usuwanie podczas dializy anionów SO_4^{2-} u chorych ze SNN może mieć ważne kliniczne znaczenie. W tym aspekcie stosowanie dializy otrzewnowej pozwala na utrzymanie siarczanów na stałym, dwukrotnie podwyższonym stężeniu.

Przedstawione badania pozwoliły ocenić i porównać występujące zmiany w stężeniach produktów beztlenowych przemian siarki cysteiny t.j. siarki „związanej” i siarczanów na tle towarzyszących temu oksydacyjnych uszkodzeń (poziom MDA i karbonylacji białek). Badania przeprowadzone w osoczu chorych ze SNN w okresie predializacyjnym (ND) i poddawanych CAPD oraz w grupie kontrolnej. Uzyskane wyniki wykazały korzystny wpływ dializy otrzewnowej w stosunku do grupy ND zarówno ze względu na mniejszy stres oksydacyjny, jak również na prawidłowe stężenie siarki „związanej”.

Piśmiennictwo

1. Aebi S., Lauterburg B.H.: Divergent effects of intravenous GSH and cysteine on renal and hepatic GSH. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1992, 263, R348.

2. **Bald E., Chwatko G., Drzewoski J.**: Extracellular thiol redox status evaluation by High-performance liquid chromatography with ultraiolet detection. International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC Kyoto) Kyoto, Japan, Chromatography, September 11-14 2011, 22, 191.
3. **Barbnoux A.S., Morena M., Badiou S. et al.**: Stress carbonylé et modifications oxydatives des protéines au cours de l'insuffisance rénale chronique = Carbonyl stress and oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Ann. Biol. Clin.* 2009, 67, 153.
4. **Bartosz G.**: *Druga twarz tienu*, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa, 2006, 359.
5. **Chuang C.K., Lin S.P., Chen H.H. et al.**: Plasma free amino acids and their metabolites in Taiwanese patients on hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin. Chim. Acta* 2006, 364, 209.
6. **Chih-Hung G., Pei-Chung C., Maw-Sheng Y. et al.**: Cu/Zn ratios are associated with nutritional status, oxidative stress, inflammation, and immune abnormalities in patients on peritoneal dialysis. *Clin. Biochem.* 2011, 44, 275.
7. **Cooper A.J.**: Biochemistry of sulfur containing amino acids. *Annu. Rev. Biochem.* 1983, 52, 187.
8. **Dodgson K.S.**: Determination of inorganic sulphate on the enzymic and nonenzymic of carbohydrate and other sulphate esters. *Biochem. J.* 1961, 78, 312.
9. **Dombkowski R.A., Russell M.J., Olson K.R.**: Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004, 286, R 678.
10. **Druml W., Fischer M., Liebisch B. et al.**: Elimination of amino acids in renal failure. *Am. J. Clin. Nutr.* 1994, 60, 418.
11. **Erdogan C., Ünlüerci Y., Türkmen A. et al.**: The evaluation of oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Clin. Chim. Acta* 2002, 322, 157.
12. **Everett S.A., Folkes L.K., Wardman P.**: Free-radical repair by a novel perthiol: reversible hydrogen transfer and perthyl radical formation. *Free Rad. Res.* 1994, 20, 387
13. **Galli F., Ghibelli L., Buoncristiani V. et al.**: Mononuclear leukocyte apoptosis in haemodialysis patients: the role of cell thiols and vitamin F. *Nephrol. Dial. Transplantation* 2003, 18, 1592.
14. **Garibotto G., Sofia A., Saffioto S. et al.**: Interorgan exchange of amino thiols in humans. *Endocrinol. Meth. Am. I. Physio. Endocino. Metab.* 2002, 284, E757.
15. **Hasuike Y., Nakanishi T., Moriguchi R. et al.**: Accumulation of cyanide and thiocyanide in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2004, 19, 1474.
16. **Himmelfard J.**: Oxidative stress in hemodialysis. *Contrib. Nephrol.* 2008, 161, 132.
17. **Hinchman C.A., Ballatori N.**: Glutathione-degrading capacities of liver and kidney in different species. *Biochem. Pharmacol.* 1990, 40, 1131.
18. **Iciek M., Włodek L.**: Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive reduced sulfane sulfur. *Pol. J. Pharmacol.* 2001, 53, 215.
19. **Jin-Bor C., Tsu-Kung L., Chia-Wei L. et al.**: Correlation of oxidative stress biomarkers and peritoneal urea clearance with mitochondrial DNA copy number in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Am. J. Nephrol.* 2008, 28, 853.
20. **Kayabasi H., Sit D., Atay A.E. et al.**: Parameters of oxidative stress and echocardiographic indexes in patients on dialysis therapy. *Ren. Failure* 2010, 32, 328.
21. **Kaiyama H., Noima Y., Mitsunashi H. et al.**: Elevated levels of serum sulfite i patients with chronic renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000, 11, 923.
22. **Lowry O., Rosebrough N.J., Farr A.L. et al.**: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 205.
23. **Lucchi L., Bergamini S., Iannone A. et al.**: Erythrocyte susceptibility to oxidative stress in chronic renal failure patients under different substitutive treatments. *Artificial. Organs* 2005, 29, 67.
24. **Lysaght M.**: Preservation of residual renal function in maintenance dialysis patients. *Perit. Dial. Int.* 1996, 16, 126.
25. **Maggi E., Bellazzi R., Falashi F. et al.**: Enhanced LDL oxidation in uremic patients. An additional mechanism for accelerate atherosclerosis. *Kidney Int.* 1994, 45, 876.
26. **Marangella M., Petrarulo M., Casseddu D. et al.**: Plasma profiles and removal rates of inorganic sulphate and their influence on serum ionized calcium I patents on maintenance haemodialysis. *Clin. Sci.* 1991, 80, 489.
27. **Michalk D., Tschöpe W., Böhles H.J. et al.**: Possible role of inorganic sulphate in the pathogenesis of hyperparathyroidism in chronic renal failure. *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.* 1981, 18, 561.
28. **Mimic-Oka J., Simic T., Djukanovic L. et al.**: Alteration in plasma antioxidant capacity in various degree of chronic renal failure. *Clin. Nephrol.* 1999, 51, 233.
29. **Moustapha A., Gupta A., Robinson K. et al.**: Prevalence and determinants of hyperhomocysteinemia in hemodialysis and peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 1999, 55, 1470.
30. **Mukhopadhyay S., Ghosh A., Kar M.**: Methyl-glyoxal increase in uremia with special reference to snakebite-mediated acute renal failure. *Clin. Chim. Acta* 2008, 391, 13.
31. **Munday R., Munday J.S., Munday C.M.**: Comparative effects of mono- di- tri, and tetrasulfides derived from plants of the Allium family: redox cycling in vitro and hemolytic activity and Phase 2 enzyme induction in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 2003, 34, 1200.
32. **Mustafa G., Khan I.U., Khan M.K. et al.**: Antioxidant level in normal and dialyzed patients using FRAP method. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2010, 23, 175.
33. **Mutlu-Türkoglu Ü., İlhan E., Öztezcan S. et al.**: Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. *Clin. Biochem.* 2003, 36, 397.
34. **Nkabuyo Y., Gu L.H., Jones D.P. et al.**: Thiol/disulfide redox status is oxidized in plasma and small intestinal and colonic mucosa of rats with inadequate sulfur amino acid intake. *J. Nutr.* 2006, 136, 1242.
35. **Ogasawara Y., Isoda S., Tanabe S.**: Tissue and subcellular distribution of bound and acid-labile sulfur, and the enzymic capacity for sulfide production in rat. *Biol. Pharm. Bull.* 1994, 17, 1535.
36. **Ogasawara Y., Jshii K., Togowa T. et al.**: Determination of bound sulfur In serum by gas dialysis/high - performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 1993, 215, 73.
37. **Ostrowski J., Rutkowski B.**: Wolne rodniki w nefrologii. *Nephrol. Dial. Pol.* 2000, 4, 14.
38. **Perna A.F., Luciano M.G, Ingresso D. et al.**: Hydrogen sulphide - generating pathways in haemodialysis patients: a study on relevant metabolites and transcriptional regulation of genes encoding for key enzymes. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009, 24, 3756.
39. **Reznick A.Z., Packer L.**: Oxidative damage to proteins: spectrophotometric metod for carbonyl assai. *Meth. Enzymol.* 1994, 233, 357.
40. **Sen C.K.**: Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr. Top Cell Regul.* 2000, 36, 1.
41. **Siems W., Quast S., Carliccio G. et al.**: Oxidative stress in chronic renal failure as a eardiovascular risk factor. *Clin. Nephrol.* 2002, 58, 12.
42. **Tallgren L.G.**: Inorganic sulfate in relation to the serum thyroxine level and in renal failure. *Ada. Med. Scand.* 1980, 640, 1.
43. **Tarrg D.C., Chen T.W., Huang T.P. et al.**: Increased oxidative damage to peripheral blood leukocyte DNA in chronic peritoneal dialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, 13, 1321.
44. **Toohey J.L.**: Sulphane sulphur in biological systems: a possible regulatory role. *Biochem. J.* 1989, 264, 625.
45. **Toohey J.L.**: Persulfide sulfur is a growth factor for cells defective in sulfur metabolism. *Biochem. Cell Biol.* 1986, 64, 758.
46. **Valentini J., Grotto D., Paniz C. et al.**: The influence of hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. *Biomed. Pharmacother.* 2008, 62, 378.
47. **Vaziri N.D., Dicus M., Ho N.D. et al.**: Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Internat.* 2003, 63, 179.
48. **Von de Poll M.C.G., Soeters P.B., Deutz N.E.P. et al.**: Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79, 185.
49. **Ward R., McLeish K.**: Oxidant stress in hemodialysis patients: what are the determining factors? *Artif. Organs* 2003, 27, 230.
50. **Włodek P.J., Iciek M.B., Miłkowski A.**: Various forms of plasma cysteine and its metabolites in patients undergoing hemodialysis. *Clin. Chim. Acta* 2001, 304, 9.
51. **Włodek P., Marcykiewicz B., Iciek M. et al.**: Thiol levels, protein carbonylation and anaerobic sulfur metabolism in erythrocytes of peritoneal dialysis and predialysis patients. *Nephrology* 2010, 15, 755.
52. **Xu Z., Wood T.C., Adjei A.A. et al.**: Human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase: radiochemical enzymate assay biochemical properties and hepatic variatun. *Drug Metab. Dispos.* 2001, 29, 172.
53. **Zwolińska D., Grzeszczak W., Kiliś-Pstrusińska K. et al.**: Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in children with chronic renal failure. *Pediatr. Nephrol.* 2004, 19, 888.