

## Οξειδωτικό stress στην αιμοκάθαρση. Ανίχνευση δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου. Θεραπευτικές στρατηγικές

**Δ. Γαλάρης<sup>1</sup>**  
**Z. Μητρογιάννη<sup>2</sup>**  
**Κ. Σιαμόπουλος<sup>2</sup>**

Οξειδωτικό stress σε έναν οργανισμό ή ένα κύτταρο ονομάζεται η κατάσταση στην οποία τα επίπεδα των προ-οξειδωτικών παραγόντων είναι αυξημένα σε σχέση με τα φυσιολογικά. Η αύξηση αυτή μπορεί να προέρχεται, είτε από επιτάχυνση του ρυθμού δημιουργίας τους, είτε από μείωση της ικανότητας απομάκρυνσής τους<sup>1,2</sup>. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι οξειδωτικοί αυτοί παράγοντες αντιπροσωπεύονται από ενδιάμεσους μεταβολίτες της αναγωγής του οξυγόνου σε νερό οι οποίοι είναι αρκετά δραστικές ενώσεις και καλούνται «δραστικές μορφές οξυγόνου» (reactive oxygen species, ROS), όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, το οξειδωτικό stress είναι δυνατό να δημιουργείται με αρκετούς και εν πολλοίς διαφορετικούς μηχανισμούς<sup>3,4</sup>. Στους μηχανισμούς αυτούς εμπλέκονται τόσο ενδογενή νεφρικά κύτταρα, όσο και φλεγμονώδη κύτταρα τα οποία προσελκλήθηκαν στο νεφρό μέσω της έκλυσης διαφόρων χημειοτακτικών παραγόντων. Εντατική έρευνα στο πεδίο αυτό την τελευταία δεκαετία έχει δείξει ότι η έκθεση σε χαμηλά, μη-θανατηφόρα, επίπεδα οξειδωτικού stress έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση πολλών μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι ρυθμίζουν τη συγχρονισμένη έκφραση δεκάδων γονιδίων<sup>5,6</sup>. Αποτέλεσμα αυτής της δράσης είναι επιπτώσεις στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων, ενώ, εάν τα επίπεδα του οξειδωτικού stress υπερκεράσουν την αμυντική ικανότητα των κυττάρων, μπορεί να προκληθεί κυτταρικός θάνατος, είτε με τη διαδικασία της απόπτωσης είτε με νέκρωση<sup>7,8</sup>.

Η δημιουργία οξειδωτικών παραγόντων εννοείται ιδιαίτερα στο τελευταίο στάδιο της νεφρικής ανεπάρκειας, όταν οι ασθενείς υποβάλλονται σε συνεχή αιμοκάθαρση. Στο στάδιο αυτό φαίνεται να προκαλείται συστηματικό οξειδωτικό stress το οποίο είναι πιθανό να ευθύνεται για ένα μέρος τουλάχιστον από τις παρενέργειες της αιμοκάθαρσης. Οξείδωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL), πρόκληση βλαβών στο κυτταρικό DNA, τροποποιήσεις, αλλά και ομοιοπολικές διασυνδέσεις πρωτεϊνών, είναι μερικές από τις βλαβερές επι-

<sup>1</sup> Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και Νεφρολογική Κλινική Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων



αμυντικοί αυτοί μηχανισμοί υπερκεραστούν, ανατρέπεται η προοξειδωτική-αντιοξειδωτική ισορροπία σε βάρος του δεύτερου σκέλους (μία κατάσταση η οποία συνήθως καλείται «οξειδωτικό stress») με καταστροφικά για το κύτταρο αποτελέσματα.

Παρ' όλη την αφθονία αμυντικών ενζύμων σε όλους τους ιστούς των αερόβιων οργανισμών, οι δραστικές μορφές οξυγόνου μπορούν να διαφύγουν και να αντιδράσουν με όλα τα βασικά συστατικά του κυττάρου προκαλώντας αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών. Σ' αυτή την περίπτωση, είναι απαραίτητες οι μικρού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικές ουσίες. Ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων, γνωστών ως αντιοξειδωτικά, ευρίσκονται στα κύτταρα και αντιδρώντας με τυχόν σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες τις μετατρέπουν σε μη ενεργές ενώσεις οι οποίες δεν είναι ελεύθερες ρίζες. Αν και πολλές χημικές ενώσεις μπορούν να δράσουν με αυτό τον τρόπο, για να θεωρηθεί μια ένωση αποτελεσματικό βιολογικό αντιοξειδωτικό, πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις όπως: (α) να υπάρχει σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις στα κύτταρα, (β) το προϊόν της αντίδρασης, όσον αφορά το αντιοξειδωτικό, να είναι σχετικά σταθερό, ούτως ώστε να σταματούν οι αλυσωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών και (γ) να είναι δυνατή η επαναδημιουργία της αρχικής ένωσης. Το ασκορβικό οξύ συνδυάζει όλες τις παραπάνω ιδιότητες και, ως εκ τούτου, έχει θεωρηθεί ως το ιδανικό αντιοξειδωτικό για όλους τους αερόβιους οργανισμούς. Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι, το ασκορβικό οξύ δεν είναι μόνο ένα καλό αντιοξειδωτικό, αλλά παίζει σημαντικό ρόλο σαν συνυπόστρωμα σε μία σειρά από αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται από μία ομάδα ενζύμων, τις «δυσυγονάσες». Αρκετά μέλη της οικογένειας αυτής των ενζύμων είναι γνωστά, αλλά περισσότερο υπολογίζεται να ανακαλυφθούν στο άμεσο μέλλον. Τα ένζυμα αυτά, και κατά συνέπεια και το ασκορβικό οξύ, εμπλέκονται σε απαραίτητες κυτταρικές διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η έκφραση γονιδίων, η ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών και άλλες<sup>12</sup>.

### Δραστικές μορφές αζώτου

Για πολλά χρόνια, τα οξειδία του αζώτου ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ) ήταν γνωστά σαν παραπροϊόντα της φωτοχημικής μόλυνσης της ατμόσφαιρας σε διάφορες μεγαλουπόλεις, όπως η Αθήνα, και εθεωρείτο ότι είχαν βλαπτικές επιπτώσεις στον αν-

θρώπινο οργανισμό. Κατά συνέπεια, προκάλεσε μεγάλη έκπληξη, όταν, στη δεκαετία του 80, αποδείχθηκε ότι ο ενδοθηλιοπαραγόμενος παράγοντας χάλασης (EDRF, endothelial derived relaxing factor) των αγγείων ταυτοποιήθηκε με το μονοξείδιο του αζώτου ( $\text{NO}$ ). Γρήγορα μετά την κατανόηση του ρόλου του  $\text{NO}$  στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου, ακολούθησε και η ανακάλυψη των ενζύμων τα οποία είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία του *in vivo*. Τα ένζυμα αυτά ονομάστηκαν «συνθήσες του  $\text{NO}$ » (NOS) και καταλύουν την οξειδωση του αμινοξέος αργινίνη, με πέντε ηλεκτρόνια, σε κυτρουλίνη και το σχηματισμό  $\text{NO}$ . Στην αντίδραση συμμετέχουν επίσης το NADPH και το  $\text{O}_2$  σαν συνυποστρώματα σε μία όχι επακριβώς καθορισμένη στοιχειομετρία. Έχουν απομονωθεί και μελετηθεί τρία είδη NOS. Το πρώτο βρέθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα (eNOS), το δεύτερο στον νευρικό ιστό (nNOS), ενώ το τρίτο είναι ένα επαγόμενο ένζυμο το οποίο δημιουργείται μόνο κάτω από ορισμένες συνθήκες (κυρίως σε συνθήκες οξειδωτικού stress) σε μία σειρά από διαφορετικούς ιστούς (iNOS).

Μετά από αυτές τις ανακαλύψεις, το ενδιαφέρον για τη χημεία και τη βιοχημεία του  $\text{NO}$  ανέβηκε κατακόρυφα με αποτέλεσμα να μελετηθούν με κάθε λεπτομέρεια όλες οι πιθανές αντιδράσεις του, αλλά και οι πιθανές φυσιολογικές λειτουργίες των προϊόντων αυτών των αντιδράσεων. Πολλά από αυτά τα προϊόντα (π.χ. το  $\text{NO}_2$  και το  $\text{ONOO}^-$ ) είναι εξαιρετικά δραστικά και φαίνεται πολλές φορές να αποτελούν ενδιάμεσες μορφές για τις τοξικές επιπτώσεις του  $\text{NO}$  *in vivo*. Οι ενώσεις αυτές, λόγω κυρίως της μεγάλης φυσιολογικής και παθοφυσιολογικής σημασίας που απέκτησαν, τείνουν να αποτελέσουν μία ξεχωριστή ομάδα κάτω από το γενικό τίτλο «δραστικές μορφές αζώτου».

Η βιοσύνθεση σχετικά μικρών ποσοτήτων  $\text{NO}$  από τις eNOS και nNOS φαίνεται να σχετίζεται με τη φυσιολογική δράση του  $\text{NO}$  στο αγγειακό, το νευρικό και το ανοσολογικό σύστημα. Η βιοσύνθεση όμως σχετικά μεγάλων ποσοτήτων  $\text{NO}$  από την iNOS συνδέεται με τη τοξικότητα του  $\text{NO}$  η οποία έχει παρατηρηθεί, όχι μόνο εναντίον ξένων εισβολέων, αλλά και εναντίον κυττάρων του ίδιου του οργανισμού. Η κυτταροτοξικότητα αυτή πιστεύεται ότι δεν οφείλεται απευθείας στο  $\text{NO}$ , αλλά σε δευτερεύοντα προϊόντα μετά την αντίδρασή του με άλλα μόρια<sup>13</sup>. Το περοξυνιτρώδες ( $\text{ONOO}^-$ ), το οποίο σχηματίζεται με την αντίδρα-

ση του NO<sup>•</sup> με το O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (αντίδραση 1), θεωρείται από τους κύριους υπεύθυνους για την έκφραση της τοξικότητας του NO<sup>•</sup>.



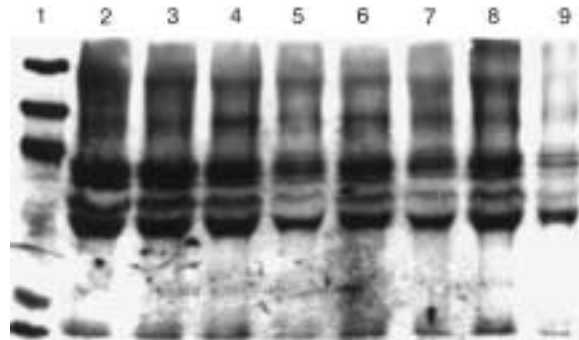
Απ' ευθείας ανίχνευση του ONOO<sup>-</sup> in vivo δεν είναι δυνατή, λόγω της υψηλής δραστηριότητας αυτού του μορίου. Μπορούν, όμως, να ανιχνευτούν ορισμένα σχετικά σταθερά προϊόντα της αντίδρασης του με βιολογικά συστατικά, όπως οι πρωτεΐνες. Ο κατ' εξοχήν χρησιμοποιούμενος δείκτης είναι η ανίχνευση νιτροσυλιωμένων καταλοίπων τυροσίνης σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

### Οξειδωτικό stress στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς

Αν και αρκετές διαφορετικές πηγές δημιουργίας δραστηκών μορφών οξυγόνου και αζώτου θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνες για το οξειδωτικό stress, το οποίο παρατηρείται στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, η ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων του αίματος κατά την επαφή τους με ξένες επιφάνειες κατά τη διάρκεια της συνεδρίας, φαίνεται να αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες. Τα διάφορα φαγοκύτταρα, μετά τη διέγερσή τους, αυξάνουν δραματικά την κατανάλωση οξυγόνου, το οποίο όμως ανάγεται σε ανιόν του σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) με τη δράση της «οξειδάσης του NADPH», η οποία ευρίσκεται στη πλασματική τους μεμβράνη. Τα διεγερμένα φαγοκύτταρα παράγουν επίσης NO<sup>•</sup>, μέσω της iNOS, το οποίο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μπορεί να αντιδράσει με το O<sub>2</sub><sup>•-</sup> και να σχηματιστεί το τοξικό ONOO<sup>-</sup>.

Χρησιμοποιώντας ένα ειδικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει πρωτεΐνες που έχουν νιτροσυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης και με ανάλυση Western blotting, παρατηρήθηκαν, για πρώτη φορά στο εργαστήριό μας, αυξημένα επίπεδα νιτροσυλιωμένων πρωτεϊνών σε ασθενείς οι οποίοι υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση (ένα χαρακτηριστικό πείραμα φαίνεται στο σχήμα 2). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει τη δημιουργία αλλά και πιθανή τοξική δράση δραστηκών μορφών αζώτου στους ασθενείς αυτούς.

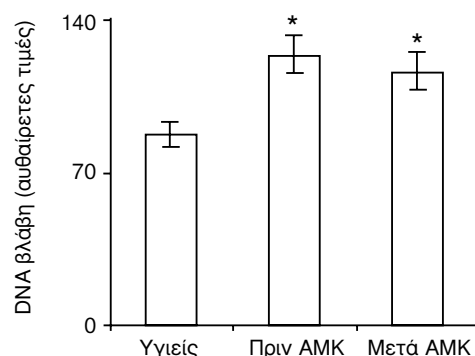
Επί πλέον, γνωρίζοντας ότι το ONOO<sup>-</sup>, αλλά και άλλες δραστηκές μορφές οξυγόνου και αζώτου, εκτός από τις πρωτεΐνες, μπορούν να προκαλέσουν βλάβες και στο κυτταρικό DNA<sup>14-17</sup>, ελέγξαμε τα επίπεδα βλαβών στο DNA λεμφοκυττάρων



Σχ. 2. Αυξημένα επίπεδα νιτροσυλιωμένων τυροσινών σε πρωτεΐνες του πλάσματος 5 ασθενών (στήλες 2, 3, 4, 6 και 8) σε σύγκριση με υγιείς δότες (στήλες 5, 7 και 9). Η στήλη 1 δείχνει δείκτες μοριακού βάρους.

από αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς (με τη μέθοδο comet assay) και τα συγκρίναμε με αντίστοιχους υγιείς δότες (Σχ. 3). Τα επίπεδα σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς, αλλά αυτό μπορεί να υποδηλώνει τη δράση και άλλων παραγόντων εκτός του ONOO<sup>-</sup>.

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τα επίπεδα του οξειδωτικού stress και του οποίου η σημασία έχει, κατά τη γνώμη μας, κακώς υποβασμιστεί είναι η διάχυση μικρού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικών ενώσεων (κυρίως του ασκορβικού οξέος) δια μέσου του φίλτρου της αιμοκάθαρσης. Μετρήσεις στο δικό μας, αλλά και σε άλλα ερευνητικά εργαστήρια, έχουν δείξει ότι ασθενείς οι οποίοι υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση έχουν



|           |             |        |      |
|-----------|-------------|--------|------|
| Υγιείς:   | 87 ± 12     |        | n=8  |
| Πριν AMK: | 123 ± 16,9* | p<0.01 | n=13 |
| Μετά AMK: | 116 ± 17,3* | p<0.01 | n=13 |

Σχ. 3. Μέτρηση των επιπέδων των σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση (AMK) και σύγκρισή τους με υγιείς.

πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέος στο πλάσμα (25% περίπου σε σχέση με τους υγιείς). Επί πλέον, ένα 50% περίπου της ποσότητας αυτής χάνεται κατά τη διάρκεια κάθε συνεδρίας, μέσω διάχυσης, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις ασκορβικού στο πλάσμα πολλών ασθενών μετά το πέρας της συνεδρίας να είναι λίγο παραπάνω από το όριο για την εκδήλωση σκορβούτου (περίπου 5  $\mu\text{M}$ , ενώ για την εκδήλωση συμπτωμάτων πρέπει να είναι κάτω από τα 3  $\mu\text{M}$ ). Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις πολλαπλές επιδράσεις του ασκορβικού σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πιστεύουμε ότι η διατήρηση του ασκορβικού στα φυσιολογικά επίπεδα θα είχε ευεργετικά αποτελέσματα για τους ασθενείς. Ως εκ τούτου, εξωγενής προσθήκη μιας φυσιολογικής συγκέντρωσης ασκορβικού στο διάλυμα αιμοκάθαρσης, ούτως ώστε να διατηρούνται σταθερά τα επίπεδα της ένωσης αυτής στο αίμα των ασθενών, είναι μια προφανής προοπτική για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού stress.

**D. Galaris, Z. Mitroyanni, K. Siamopoulos. Oxidative stress in hemodialysis. Tracing active forms of oxygen and nitrogen. Therapeutic strategies. Hellen Nephrol 2002; 14 (Supplement 1): 27 - 31.**

*Λέξεις κλειδιά: αιμοκάθαρση, οξειδωτικό stress.*

## Βιβλιογραφία

1. Sies H. Oxidative stress. Introduction remarks. In: Sies H, ed. Oxidative Stress. Academic Press, London; 1985; 1-8.
2. Halliwell B, Gatteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. In: Third Edition. Oxford: Oxford Science Publications, 1999.
3. Haugen E, Nath KA. The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. Blood Purif 1999; 17: 58-65.
4. Roselaar SE, Nazhat NB, Winyard PG, Jones P, Cunningham J, Blake DR. Detection of oxidants in uremic plasma by electron spin resonance spectroscopy. Kidney Int 1995; 48: 199-206.
5. Forman HJ, Cadenas E. Oxidative Stress and Signal Transduction. Chapman and Hall, New York; 1997.
6. Finkel T. Oxygen radicals and signaling. Curr Opin Cell Biol 1998; 10: 243-253.
7. Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, Yamasaki Y, Ota Z. Apoptosis in glomerular sclerosis. Kidney Int 1996; 49: 103-111.
8. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. Free Radic Biol Med 2000; 29: 323-333.
9. Maggi E, Bellazzi R, Falaschi F, et al. Enhanced LDL oxidation in uremic patients: An additional mechanism for accelerated atherosclerosis? Kidney Int 1994; 45: 876-883.
10. Wratten ML, Galaris D, Tetta C, Sevanian A. Oxidant stress, cardiovascular disease and hemodialysis patients. Antioxid Redox Signal 2002; (in press).
11. Stopper H, Boullay F, Heidland A, Vienken J, Bahner U. Comet-assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients. Am J Kidney Dis 2001; 38: 296-301.
12. Arrigoni O, De Tullio MC. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. Biochim. Biophys Acta 2002; 1569: 1-9.
13. Greenacre SAP, Ischiropoulos H. Tyrosine nitration: Localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. Free Radic Res 2001; 34: 541-581.
14. Panagiotidis M, Tsolas O, Galaris D. Glucose oxidase-produced  $\text{H}_2\text{O}_2$  induces  $\text{Ca}_2+$ -dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. Free Radic Biol Med 1999; 26: 548-556.
15. Doulias P-T, Barbouti A, Galaris D, Ischiropoulos H. SIN-1-induced DNA damage in isolated human peripheral blood lymphocytes as assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay) Free Radic Biol Med 2001; 30: 679-685.
16. Barbouti A, Doulias P-T, Zhu B-Z, Frei B, Galaris D. Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA damage. Free Radic Biol Med 2001; 31: 490-498.
17. Tselepis A, Doulias P-T, Lourida E, Glantzounis G, Tsimoyiannis E, Galaris D. Trimetazidine protects low-density lipoproteins from oxidation and cultured cells exposed to  $\text{H}_2\text{O}_2$  from DNA damage. Free Radic Biol Med 2001; 30: 1357-1364.

*Αλληλογραφία:*

Δ. Γαλάρης

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ιωάννινα 45 110