

Oxidačný stres a antioxidačné systémy u hemodialyzovaných chorých

O. Rácz^{1,2}, M. Mydlík³, A. Chmelárová³, K. Derzsiová¹, D. Maceková¹, F. Ništiar¹, E. Lovásová¹, B. Fodor²

¹ Ústav patologickej fyziológie Lekárskej fakulty UPJŠ Košice, Slovenská republika, prednosta prof. MUDr. Oliver Rácz, CSc.

² Institute of Nanobiotechnology and Regenerative Medicine, Miskolc University, Hungary, head Fodor Bertalan, MSc, PhD, EurClinChem

³ Ústav experimentálnej medicíny Lekárskej fakulty UPJŠ, Košice, Slovenská republika, prednosta MUDr. Alojz Bomba, DrSc.

Súhrn: Autori podávajú kritickú analýzu súčasných poznatkov o oxidačnom strese a o aktivite antioxidačných systémov u chorých s chronickými chorobami obličiek so zvláštnym zreteľom na hemodialyzovaných chorých. Napriek tomu, že prítomnosť zvýšeného oxidačného stresu u týchto chorých je dobre dokumentovaná, mnohé otázky ostávajú otvorené. V prehľade je opísaná patobiochémia oxidačného stresu pri hemodialýze, analýza súčasných poznatkov o lipidovej peroxidácii a aktivite antioxidačných enzýmov v červených krvinkách pri týchto ochoreniach. Na záver autori hodnotia názory na opodstatnenosť exogénnej suplementácie antioxidačnými vitamínmi u chorých na hemodialýze. Konštatujú, že zatiaľ jedinou dokázanou možnosťou zníženia oxidačného stresu pri hemodialýze je používanie membrán s obsahom vitamínu E.

Kľúčové slová: chronické obličkové choroby – hemodialýza – oxidačný stres – antioxidačné systémy

Oxidative stress and antioxidation systems in haemodialyzed patients

Summary: The authors present a critical analysis of current knowledge on oxidative stress and on the activity of antioxidative systems in patients with chronic kidney disease with a focus on haemodialysed patients. Even though oxidative stress in these patients is well documented, a number of questions remain unanswered. The overview describes pathobiochemistry of oxidative stress during haemodialysis, analysis of current knowledge on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in the red blood cells in patients with this disease. Finally, the authors evaluate opinions on justifiability of exogenous supplementation of vitamins with antioxidant properties in patients on haemodialysis. They conclude that the use of vitamin E-containing membranes is the only evidenced option for reducing oxidative stress during haemodialysis.

Key words: chronic kidney disease – haemodialysis – oxidative stress – antioxidative systems

Úvod

Oxidačný stres a nedostatočná aktivita antioxidačných systémov pravdepodobne zohrávajú dôležitú úlohu pri rozvoji aterosklerózy u chorých s chronickými ochoreniami obličiek, ako aj u chorých v štádiu renálnej insuficiencie, ktorí sú liečení hemodialýzou. Prvé práce, ktoré poukázali na zvýšený oxidačný stres u hemodialyzovaných chorých, boli publikované ešte v 80. a 90. rokoch minulého storočia [1,2], ale táto problematika ostáva naďalej predmetom záujmu mnohých prác aj v súčasnosti [3–9,35].

Metódy, ktoré sa používali v minulosti na posúdenie oxidačného stresu a funkcie antioxidačných systémov, boli menej spoľahlivé ako tie, ktoré sú k dispozícii v súčasnosti [10,11]. Okrem toho došlo k zmene názorov na fyziologické účinky mierneho oxidačného stresu v tom zmysle, že malé

výkyvy rovnováhy medzi tvorbou reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a ich odstránením majú významnú vlastnosť – nepoškodzujú organizmus, ale majú dôležitú signalizačnú funkciu.

Z tohto dôvodu je potrebné kriticky posúdiť platnosť dostupných údajov týkajúcich sa oxidačného stresu a antioxidačných systémov u chorých s chronickými chorobami obličiek a u chorých liečených v hemodialyzačnom programe. Nemenej dôležité je nájsť odpovede na otázku, či je potrebná suplementácia exogénnymi antioxidantmi u týchto chorých.

Patobiochémia oxidačného stresu u chorých s chronickou obličkovou chorobou a u hemodialyzovaných pacientov

Za fyziologických podmienok je intenzita tvorby voľných radikálov a reak-

tívnych foriem kyslíka v telových tekutinách, bunkách a tkanivách nízka a je plne pod kontrolou antioxidačných systémov. Základná úroveň tvorby reaktívnych foriem kyslíka je navyše súčasťou signalizačných systémov, ktoré sú zapojené do regulácie rastu, diferenciácie a metabolismu buniek [12,13].

O nefyziologickom oxidačnom strese, ktorý poškodzuje bunkové a tkanivové štruktúry, môžeme hovoriť iba vtedy, ak tvorba ROS prekročí únosnú mieru a kapacitu antioxidačnej ochrany, alebo vtedy, ak je z nejakého dôvodu oslabená funkcia antioxidačných systémov. Skutočnosť je však oveľa zložitejšia, a to z najmenej 2 dôvodov:

Antioxidačný systém ľudského organizmu je zložitý. Niektoré komponenty systému patria do skupiny exogénnych mikronutrientov, iné sú enzýmy alebo

Tab. 1. Tri úrovne a tri kompartmenty antioxidačného systému v ľudskom tele (príklady).**Tri úrovne****A. Základná úroveň – prevencia poškodenia**

štruktúra a tvar väčšiny makromolekúl (napr. hemoglobínu) a organel (mitochondrie) znižujú možnosť oxidačného poškodenia

B. Úroveň aktívnej ochrany**B1. Nízkomolekulové antioxidanty a vycytávače radikálov**

glutatión (GSH) a iné látky obsahujúce tiolovú (SH) skupinu
vitamín C, vitamín E, β -karotén
kyselina močová, taurín
koenzým Q, melatonín
niektoré flavonoidy a iné látky rastlinného pôvodu

B2. Systémy antioxidačných enzýmov

prvé dva kroky pentózového cyklu spolu s enzýmami glutatiónového metabolismu (glutatión peroxidáza a glutatión reduktáza)
superoxiddismutáza a kataláza
erytrocytárna methemoglobín reduktáza a iné enzýmy s špecifickými funkciami

B3. Nepriame antioxidanty

selén – ako súčasť enzýmu glutatión peroxidázy
vitamíny skupiny B pôsobiace ako koenzýmy v pentózovom cykle
plazmatické bielkoviny viažúce kovy (ceruloplazmín a i.)

C. Preferenčné odbúranie alebo reparácia poškodených štruktúr

rýchla obnova proteínov vo väčšine buniek
receptory pre AGE a systémy ich odbúrania
reparačné systémy nukleových kyselín

Tri kompartmenty**A. Extracelulárne antioxidanty**

vitamíny a iné exogénne látky rozpustné vo vode, plazmatické bielkoviny

B. Intracelulárne antioxidačné systémy

glutatión, enzýmové antioxidanty, koenzým Q, melatonín

C. Antioxidanty v membránach

vitamín E a iné látky rozpustné v tukoch

produkty enzýmov. Celý systém je kompartmentovaný na extracelulárne (plazmatické), intracelulárne a membránové zložky, ktoré sú síce medzi sebou prepojené, ale pri hodnotení ich významu pri chorobných procesoch nie je možné zanedbať uvedené špecifiká (tab. 1).

Okrem oxidačného stresu existuje aj karbonylový stres (napr. glykácia bielkovín a tvorba neskorých produktov glykácie [14]) a stres zapríčinený reaktívnymi formami dusíkatých látok [15,16]. Z hľadiska poškodenia buniek a tkanív všetky tieto formy

náhodných postsyntetických modifikácií makromolekúl účinkujú synergicky.

Pri chorobách obličiek dochádza k zvýšenej tvorbe ROS a ostatných látok s podobným účinkom už v ich počiatkovom a/alebo akútnom štádiu z rôznych dôvodov. Pri glomerulonefritídach a iných zápalových ochoreniach je to tvorba ROS polymorfonukleárnymi leukocytmi a makrofágmi, pri diabetickej nefropatii je to glykácia a tvorba neskorých produktov glykácie bielkovín. Iné choroby obličiek (polycystické obličky, nefrotický syndróm) sú pravdepodobne z toho hľadiska neutrálne, ale o tom chýbajú exaktné dôkazy.

V neskoršom štádiu obličkových chorôb a pri hemodialýze dochádza k jednoznačnému zvýšeniu oxidačného stresu a pokles funkcie antioxidačných systémov je pravdepodobný. Možné príčiny sú zhrnuté v tab. 2. Zvláštnym, ale dôležitým zdrojom ROS u hemodialyzovaných chorých je dialyzačná membrána.

Lipidová peroxidácia, antioxidačná kapacita plazmy a antioxidačné enzýmy pri hemodialýze

Posúdenie oxidačného stresu a funkcie antioxidačných systémov v klinickej praxi je zložitá záležitosť, pretože panel vyšetrovacích metód, ktoré sa za týchto okolností dajú použiť, je obmedzený (tab. 3). V tomto prehľade sme sa zamerali na 3 základné skupiny vyšetrení, s ktorými má naša pracovná skupina dlhoročné skúsenosti.

Na základe literárnych údajov a vlastných pozorovaní je zvýšenú peroxidáciu lipidov u hemodialyzovaných chorých možné považovať za jednoznačne dokázanú [3–5,17,18]. Na druhej strane interpretácia údajov o zníženej antioxidačnej kapacite plazmy u chorých s chronickými chorobami obličiek a liečených v rámci hemodialyzačných programov je problematická. Hlavnou príčinou tejto neistoty je, že za týmto označením sa skrýva veľký počet rôznych metód, ktorých princíp je odlišný [19–21]. Okrem metodíc-

Tab. 2. Špecifické zdroje zvýšeného oxidačného stresu u RCH a HD.

- zvýšená aktivácia polymorfonukleárných leukocytov pri zápalových ochoreniach
- uremické toxíny s priamou prooxidačnou aktivitou
- inaktivácia antioxidačných enzýmov spôsobená uremickými toxínmi (nepriame pôsobenie)
- nedostatok nízkomolekulových exogénnych antioxidantov spôsobená dietetickou reštrikciou (alebo ich zvýšená strata pri dialýze)
- uvoľnenie transportných kovov (železo) z viazanej formy a následná katalytická aktivita pri tvorbe reaktívnych foriem kyslíka
- nízka biokompatibilita hemodialyzačných membrán

kých problémov sa pri chorobách obličiek vynára aj otázka, či je možné kyselinu močovú považovať za skutočný antioxidant in vivo. Kyselina močová je in vitro silný antioxidant a ovplyvňuje výsledky rôznych metód merania celkovej antioxidačnej kapacity. Je však nepravdepodobné, že u chorých s obličkovými chorobami hyperurikémia mohla prispieť k likvidácii a neutralizácii ROS.

Pre rutinnú klinickú biochémiu sú dnes dostupné presné a spoľahlivé metódy na meranie antioxidačných enzýmov v plazme a v červených krvinkách (a na špecializovaných pracoviskách je možné merať ich aktivitu aj z bielych krviniek). Napriek tomu interpretácia výsledkov ani v tomto prípade nie je jednoduchá. Ako príklad môžeme uviesť rôzne výsledky týkajúce sa aktivity erytrocytovej superoxiddismutázy (SOD) v rôznych prácach. V našej prvej práci [17] sme nenašli signifikantné rozdiely v aktivite tohto enzýmu pred a po dialýze, pred a po perorálnom podaní vitamínu E a ani vtedy, ak sme porovnali výsledky u chorých dialyzovaných štandardnou hemodialyzovanou membránou a membránou s obsahom vitamínu E. Aktivita SOD u hemodialyzovaných chorých bola v dolnej oblasti referenčných hodnôt. Podobné výsledky sme našli aj v dlhšej, trojmesečnej štúdii [18]. V tejto štúdii sme sledovali aj aktivitu iných enzýmov – glutatiónperoxidázy, glutatiónreduktázy a katalázy, ale ani tieto sa nemenili u chorých hemodialyzovaných pomocou membrány s obsahom vitamínu E. Podobné výsledky sme našli aj u chorých na peritoneálnej dialýze [22].

Giray et al [23] potvrdili mierny pokles aktivity SOD u hemodialyzovaných chorých, ale po perorálnom podaní vitamínu E pozorovali nárast aktivity tohto enzýmu na hodnoty blízke aktivity enzýmu v kontrolnej skupine. Podobné výsledky opísali aj Montazerifar et al [24] po podávaní vitamínov C a E. Na druhej strane Antoniadí et al [25] pozorovali pokles aktivity SOD po roč-

Tab. 3. Metódy vhodné na stanovenie oxidačného stresu a funkcie antioxidačných systémov v klinických štúdiách.

- A. markery poškodenia makromolekúl pri oxidačnom strese (a iných podobných reakciách) rôzne metódy na stanovenie malondialdehydu (MDA), konjugovaných diénov a špecifických produktov lipoperoxidácie, etán vo vydychovanom vzduchu metódy na stanovenie glykácie a karbamylácie bielkovín, poškodenia DNA a iné
- B. markery odpovede na oxidačné poškodenie na bunkovej úrovni a na úrovni gémovej expresie
- C. priame stanovenie nízkomolekulových antioxidantov v krvi a v telových tekutinách (vitamíny C, E, koenzým Q a iné)
- D. integrované markery antioxidačnej kapacity v krvi a telových tekutinách (rôzne metódy na meranie antioxidačnej kapacity plazmy a iných tekutín)
- E. antioxidačné enzýmy v erytrocytoch a leukocytoch

nom podávaní vitamínu E chorým na hemodialýze.

Príčina protichodných výsledkov je čiastočne v samotnej, veľmi zložitej metodike merania tohto enzýmu, ktorá je mimoriadne citlivá na minimálne zmeny v pracovnom postupe [26]. Ďalšia príčina môže byť v rozdielnom dizajne jednotlivých štúdií.

Suplementácia exogénnymi antioxidantmi a použitie špeciálnych membrán ako spôsob boja proti oxidačnému stresu u hemodialyzovaných chorých

V niektorých štúdiách [23–25] podávanie vitamínu E (v niektorých spolu s vitamínom C) viedlo k poklesu intenzity lipidovej peroxidácie a k nárastu antioxidačnej kapacity plazmy. V iných exogénna antioxidačná suplementácia nedosiahla štatisticky významný účinok. Gordon a Himmel Farb [27] v metaanalýze došli k záveru, že blahodarný efekt antioxidantov u chorých v urémii ešte nedosahuje úroveň medicíny založenej na dôkazoch (EBM).

Druhou možnosťou zníženia oxidačného stresu je používanie špeciálnych membrán obsahujúcich vitamín E [28]. Ich pozitívny účinok, ktorý spočíva pravdepodobne v blokáde reakcie bielych krviniek na cudzorodý materiál, bol opakovane potvrdený. Slabou stránkou niektorých z týchto štúdií, vrátane našich vlastných, bol nízky počet participantov

a/alebo relatívne krátke obdobie ich trvania [4,17,18,29–31]. Metaanalýza uskutočnená v roku 2006 [32] a novšie práce [33,34] však jednoznačne dokázali, že použitie týchto špeciálnych membrán znižuje lipidovú peroxidáciu a má preto potenciálny klinický benefit.

Záver

Chorí v pokročilom štádiu ochorenia obličiek a chorí liečení v rámci hemodialyzačných programov majú enormne zvýšené riziko kardiovaskulárnej mortality a morbidita. Nie sú pochybnosti ani o tom, že u týchto chorých je prítomný oxidačný stres a je pravdepodobné, že oxidačný stres je dôležitým faktorom, ktorý u nich urýchľuje proces aterosklerózy.

Napriek tomu, pri kritickej analýze súčasných poznatkov patobiochémiie a patofyziológie oxidačného stresu pri obličkových ochoreniach a pri hemodialýze, musíme konštatovať, že mnohé dôležité detaily ešte nie sú objasnené. Na dosiahnutie ďalšieho pokroku v tejto oblasti sú potrebné dobre koncipované klinické štúdie, ktoré by mali zohľadniť aj vplyv základného ochorenia na oxidačný stres a na antioxidačné systémy, mali by použiť široký panel moderných a spoľahlivých metód na stanovenie oxidačného stresu a aktivity antioxidačných systémov, a mali by mať vytýčené jednoznačne definované klinické výstupy.

Použité skratky

EBM (evidence based medicine) – medicína založená na dôkazoch

MDA (malondialdehyd) – marker lipidovej peroxidácie

ROS (reactive oxygen species) – reaktívne formy kyslíka (radikály a neradikály)

SOD – superoxiddismutáza

RCH – renálne choroby

HD – hemodialýza

Literatúra

- Giardini O, Taccone-Gallucci M, Lubrano R et al. Evidence of red blood cell membrane lipid peroxidation in haemodialysis patients. *Nephron* 1984; 36: 234–237.
- Jackson P, Loughren CM, Lightbody JH et al. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin Chem* 1995; 41: 1135–1138.
- Himmelfarb J, Ikizler TA, Stenwinkel P et al. The elephant in uraemia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002; 62: 1524–1538.
- Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU et al. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1272–1280.
- Handelman GJ. Current studies on oxidant stress in dialysis. *Blood Purification* 2003; 21: 46–50.
- Westhuyzen J, Saltissi D, Stanbury V. Oxidative stress and erythrocyte integrity in end-stage renal failure patients hemodialysed using a vitamin E-modified membrane. *Ann Clin Lab Sci* 2003; 33: 3–10.
- Mircescu G, Capusa C, Stoain I et al. Global assessment of serum antioxidant status in hemodialysis patients. *J Nephrol* 2005; 18: 559–605.
- de Vecchi AF, Bamonti F, Novembrino C et al. Free and total plasma malondialdehyde in chronic renal insufficiency and in dialysis patients. *Nephrol Dialysis Transplant* 2009; 24: 3532–3538.
- Li RY. Free radicals and related reactive species in renal diseases. In: Li RY. *Free Radical Biomedicine: Principles, Clinical Correlations, and methodologies*. Bentham Science 2012: 202–216.
- Hoelzl C, Bichler J, Ferk F et al. Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: A critical review with particular emphasis on human intervention studies. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56 (Suppl 2): 49–64.
- Li RY. Detection of damage of biomolecules by free radicals and related reactive species. In: Li RY (ed.). *Free Radical Biomedicine: Principles, Clinical Correlations, and methodologies*. Bentham Science 2012: 295–306.
- Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 247–254.
- Preiser JC. Oxidative stress. *J Parenter Enteral Nutr* 2012; 36(2): 147–154.
- Jakuš V, Rietböck N. Intermediárne a koncové produkty neenzýmovej glykácie. *Chem Listy* 1999; 93: 375–381.
- Oigino K, Wang DH. Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta Med Okayama* 2007; 61: 181–189.
- Lovásová K, Lovásová E, Rácz O et al. Oxidusnatý opäť v popredí pozornosti – nový pohľad na diabetické komplikácie kardiovaskulárneho systému. In: *Patofyziologie 2008. Sborník příspěvků 17. konference Českých a slovenských patofyziologů*. 1. LF UK: 48.
- Mydlík M, Derzsiová K, Šipulová A et al. A modified dialyzer with vitamin E and antioxidant defense parameters. *Kidney International* 2001; 59 (Suppl 78): S144–S147.
- Mydlík M, Derzsiová K, Rácz O et al. Vitamin E-coated dialyzer and antioxidant defense parameters: Three-month study. *Seminars Nephrol* 2004; 24: 525–531.
- Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agricult Food Chem* 2005; 53: 1841–1856.
- Malliaraki N, Mpliamplias D, Kampa M et al. Total and corrected antioxidant capacity in hemodialyzed patients. *BMC Nephrology* 2003; 4: 1–8.
- Scurati-Manzoni E, Cighetti G. Free and total malondialdehyde in chronic renal insufficiency and in dialysis patients. *Nephrol Dialysis Transplant* 2009; 24: 2524–2529.
- Mydlík M, Derzsiová K, Rácz O et al. Vitamin E as an antioxidant agent in CAPD patients. *Int J Artificial Organs* 2002; 25: 373–378.
- Giray B, Kan E, Bali M et al. The effect of vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in hemodialysis patients. *Clin Chim Acta* 2003; 338: 91–98.
- Montazerifar F, Hashemi M, Karajibani M et al. Effect of combined vitamins C and E supplementation on oxidant/antioxidant status in hemodialysis patients. *Mediterr J Nutr Metab* 2010; 3: 159–163.
- Antoniadi G, Eleftheriadis T, Liakopoulou V et al. Effect of one-year oral alpha-tocopherol administration on the antioxidant defense system in hemodialysis patients. *Therap Apheresis Dialysis* 2008; 12: 237–242.
- Šipulová A, Rácz O. Hodnotenie a modifikácia metódy Ransod. *Lab Diagnost* 1997; 2: 144–148.
- Gordon CA, Himmelfarb J. Antioxidant therapy in uremia: Evidence-based medicine? *Seminars Dialysis* 2004; 17: 327–332.
- Sasaki M. Development of vitamin E-modified polysulfone membrane dialyzers. *J Artificial Org* 2006; 9: 50–60.
- Libetta C, Zucchi M, Gori E et al. Vitamin E-loaded dialyzer resets PBMCO-operated cytokine network. *Kidney Int* 2004; 65: 1473–1481.
- Kojima K, Oda K, Homma H et al. Effect of vitamin E-bonded dialyzer on eosinophilia. *Nephrol Dialysis Transplant* 2005; 20: 1932–1935.
- Yang CC, Hsu SP, Wu M et al. Effects of vitamin C infusion and vitamin E-coated membrane in hemodialysis-induced oxidative stress. *Kidney Internat* 2006; 69: 706–714.
- Sosa MA, Balk EM, Lal J et al. A systematic review of the effect of the Excebrane dialyzer on biomarkers of lipid peroxidation. *Nephrol Dialysis Transplant* 2006; 21: 2825–2833.
- Banche G, Allizond V, Giacchino F et al. Effect of dialysis membrane biocompatibility on polymorphonuclear granulocyte activity in dialysis patients. *Nephrol Dialysis Transplant* 2006; 21: 3532–3538.
- Takouli L, Hadjiyannakos D, Metaxaki P et al. Vitamin E-coated cellulose acetate dialysis membrane: Long-term effect on inflammation and oxidative stress. *Renal Failure* 2010; 32: 287–293.
- Vostálová J, Galandáková A, Štrebl P et al. Oxidačný stres u pacientů s onemocněním ledvin. *Vnitř Lék* 2012; 58: 202–207.

prof. MUDr. Oliver Rácz, CSc.

patfyz.medic.upjs.sk

e-mail: olliracz@gmail.com

Doručeno do redakce: 28. 5. 2012