



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ**

**ΜΗΤΡΟΓΙΑΝΝΗ ΖΩΪΤΣΑ  
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**



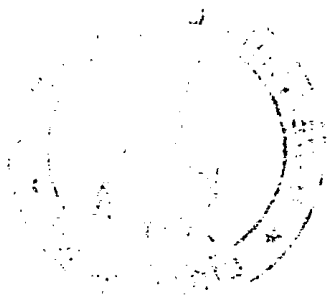
**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008**



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000304425



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202,  
παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).



**Ημερομηνία αίτησης της κ. Μητρογιάννη Ζωΐτσας: 27-4-2001**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 447<sup>α</sup>/14-6-2001**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας –Νεφρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Γαλάρης Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τσελέπης Αλέξανδρος Αναπληρωτής καθηγητής Βιολογικής Χημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 2-7-2001**

*«Οξειδωτικό stress στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 642<sup>α</sup>/8-7-2008**

<b>Γαλάρης Δημήτριος</b>	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Ελισάφ Μωυσής</b>	Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος</b>	Καθηγητής Παθολογίας –Νεφρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Τσελέπης Αλέξανδρος</b>	Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Φατούρος Μιχαήλ</b>	Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Κατωπόδης Κωνσταντίνος</b>	Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μήτσης Μιχαήλ</b>	Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής -Μεταμοσχεύσεων Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 8-7-2008**

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Ιωάννης Γουδέβενος**

**Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας**



Επικεφαλής της Σχολής

α





## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε συνεργασία με την Νεφρολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Η επίβλεψη της διδακτορικής μου διατριβής από τον κ. Κων/νο Σιαμόπουλο, Καθηγητή Νεφρολογίας, αποτέλεσε για μένα μεγάλη τύχη και εξαιρετική τιμή. Τον ευχαριστώ θερμά για την συνεχή καθοδήγηση, τις εύστοχες παρατηρήσεις του και την συμπαράστασή του κατά την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Στο τμήμα της διδακτορικής μου διατριβής που αφορούσε τη βασική έρευνα ευτύχησα να έχω καθοδηγητή και συμπαράστατη τον κ. Δημήτριο Γαλάρη, Καθηγητή Βιολογικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την εμπιστοσύνη του απέναντί μου, καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για την εκπαίδευσή μου και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Χημείας κ. Αλέξανδρο Τσελέπη για το ενδιαφέρον του και την ηθική υποστήριξή του, καθώς επίσης και για την κριτική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Μωυσή Ελισάφ, Καθηγητή Παθολογίας, για το ενδιαφέρον του και την ουσιαστική συμβολή του στην σύνταξη της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ, επίσης τα έτερα μέλη της επταμελούς επιτροπής, κ. Μιχάλη Φατούρο, Καθηγητή Χειρουργικής, κ. Κων/νο Κατωπόδη, Επίκουρο Καθηγητή Νεφρολογίας και τον κ. Μιχάλη Μήτση, Επίκουρο Καθηγητή Χειρουργικής, για τις πολύτιμες υποδείξεις τους.

Η εκπαίδευση και η εξοικείωσή μου με τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής έγινε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία τους και την πολύτιμη βοήθειά τους χωρίς την οποία θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την φίλη μου και διδάκτορα Αλεξάνδρα Μπαρμπούτη για την συνεχή συμπαράσταση και το ενδιαφέρον της, καθώς και για την ουσιαστική συμβολή της στην εκπόνηση και συγγραφή της παρούσας διατριβής. Θα ήταν παράληψή μου, επίσης, να μην ευχαριστήσω την κ. Θ. Παπαμαρκάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας και τον κ. Σ. Χριστοφορίδη, Επίκουρο Καθηγητή Βιολογικής Χημείας και τους συνεργάτες τους για την πολύτιμη βοήθειά τους.



Ευχαριστώ θερμά όλους τους ιατρούς και το νοσηλευτικό προσωπικό της Νεφρολογικής Κλινικής και των μονάδων εξωνεφρικής κάθαρσης του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για την πολύτιμη βοήθειά τους στη συλλογή των βιολογικών δειγμάτων.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την σημαντική βοήθεια του κ. Βασίλη Τσιμιχόδημου, Επιμελητή ιατρού της Β' Παθολογικής Κλινικής, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά.

Τέλος ευχαριστώ τους γονείς μου Κώστα και Ουρανία και τον αδερφό μου Δημήτρη για την ηθική τους στήριξη και συμπαράσταση χωρίς την οποία θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Ζωή Μητρογιάννη

Ιωάννινα, 2008



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
<b>A. ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.2 Ορισμός της ΧΝΝ και μέθοδοι εκτίμησης της νεφρικής λειτουργίας.....	2
1.3 Στάδια της ΧΝΝ.....	3
1.4 Μέθοδοι υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας.....	5
1.4.1 Αιμοκάθαρση.....	5
1.4.2 Περιτοναϊκή κάθαρση.....	7
1.4.3 Εκτίμηση της απόδοσης της κάθαρσης.....	8
<b>B. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....</b>	<b>9</b>
2.1 Εισαγωγή.....	9
2.2 Ορισμός.....	10
2.3 Παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	11
2.4 Δραστικές μορφές οξυγόνου.....	11
2.5 Δραστικές μορφές αζώτου.....	15
2.6 Οξειδωτικό στρες.....	17
2.6.1 Ορισμός.....	17
2.7 Κυτταρικές καταστροφές από οξειδωτικό στρες.....	18
2.7.1 Λιπιδιακή υπεροξείδωση.....	19
2.7.2 Βλάβες στο DNA.....	20
2.7.3 Οξείδωση πρωτεϊνών.....	21
2.8 Νίτρωση πρωτεϊνών.....	22
2.9 Καρβονυλίωση πρωτεϊνών.....	26
2.10 Αμυντικοί μηχανισμοί.....	29
<b>Γ. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ.....</b>	<b>33</b>
3.1 Εισαγωγή.....	33
3.2 Ο ρόλος της ΧΝΝ στην εμφάνιση του οξειδωτικού στρες.....	35
3.2.1 Μέθοδοι υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας και οξειδωτικό στρες.....	37





3.2.2	Σίδηρος και οξειδωτικό στρες.....	39
3.2.3	Ερυθροποιητίνη και οξειδωτικό στρες.....	39
3.3	Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στην εξέλιξη της νεφρικής νόσου.....	40
3.4	Δείκτες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες στη ΧΝΝ.....	43
3.5	Οξειδωτικό στρες και φλεγμονή. Ποιος ο ρόλος τους στις μακροχρόνιες επιλοκές της ΧΝΝ.....	49
3.6	Θεραπευτικές στρατηγικές.....	52
<b>Δ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....</b>		<b>59</b>
<b>Ε. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>		<b>61</b>
5.1	Ασθενείς.....	61
5.2	Συλλογή των δειγμάτων.....	63
5.3	Προσδιορισμός βλάβης στις πρωτεΐνες: ανίχνευση νιτροτυροσινών και καρβονυλίων.....	63
5.3.1	Προσδιορισμός πρωτεΐνης.....	63
5.3.2	Προετοιμασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό των νιτροτυροσινών και των καρβονυλίων.....	64
5.3.3	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή δωδέκυλοθειϊκού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου.....	64
5.3.4	Μεταφορά και αποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	66
5.3.5	Ανίχνευση πρωτεϊνών με την μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.....	67
5.3.6	Χρώση των πρωτεϊνών στην πηκτή με Coomassie blue.....	68
5.4	Ανοσοκαθίζηση.....	69
5.5	Προσδιορισμός βλάβης στο DNA: Απομόνωση Β και Τ λεμφοκυττάρων από περιφερικό αίμα και ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης (Single Cell Gel Electrophoresis SCGE ή comet assay).....	69
<b>ΣΤ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....</b>		<b>75</b>



<b>Z. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>77</b>
7.1 Προσδιορισμός οξειδωτικών τροποποιήσεων πρωτεϊνών.....	77
7.1.1 Ανίχνευση νιτροτυροσινών.....	77
7.1.2 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών που υφίστανται νίτρωση σε αιμοκαθαίρομενους ασθενείς.....	89
7.1.3 Ανίχνευση καρβονυλίων.....	91
7.2 Προσδιορισμός βλαβών στο DNA των λεμφοκυττάρων αιμοκαθαίρομενων ασθενών.....	98
<b>Η. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>101</b>
<b>Θ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>113</b>
<b>Ι. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>115</b>
<b>ΙΑ. SYMMARY.....</b>	<b>117</b>
<b>ΙΒ. ΒΙΒΛΙΟΦΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>119</b>



## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

	Σελ.
Πίνακας 1. Ορισμός της ΧΝΝ- Κριτήρια.....	2
Πίνακας 2. Εξισώσεις προσδιορισμού του GFR με βάση την κρεατινίνη ορού.....	3
Πίνακας 3. Στάδια της ΧΝΝ.....	4
Πίνακας 4. Δραστικές μορφές οξυγόνου.....	14
Πίνακας 5. Δείκτες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες.....	44
Πίνακας 6. Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης.....	61
Πίνακας 7. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού των νιτροτυρισινών σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς σε ΑΚΘ.....	82
Πίνακας 8. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού των νιτροτυρισινών σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς σε ΠΚ.....	84
Πίνακας 9. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού των νιτροτυρισινών σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς με ΧΝΝ σταδίου 2.....	88
Πίνακας 10. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού των νιτροτυρισινών σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς με ΧΝΝ σταδίου 3.....	88
Πίνακας 11. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού των νιτροτυρισινών σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς με ΧΝΝ σταδίου 4.....	88
Πίνακας 12. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού της νίτρωσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς σε ΑΚΘ.....	89
Πίνακας 13. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς σε ΑΚΘ.....	91
Πίνακας 14. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς σε ΠΚ.....	95
Πίνακας 15. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς με ΧΝΝ σταδίου 2.....	97



Πίνακας 16.	Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς με ΧΝΝ σταδίου 3.....	97
Πίνακας 17.	Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς με ΧΝΝ σταδίου 4.....	97
Πίνακας 18.	Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού της βλάβης του DNA των λεμφοκυττάρων σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς σε ΑΚΘ.....	99



## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

	Σελ.
Σχήμα 1. Αναγωγή του μοριακού $O_2$ με μονά ηλεκτρόνια.....	13
Σχήμα 2. Εναλλακτικοί δρόμοι αντίδρασης του $O_2^-$ μετά το σχηματισμό του.....	17
Σχήμα 3. Επιπτώσεις από την αντίδραση των ελευθέρων ριζών με τα βασικά κυτταρικά συστατικά.....	19
Σχήμα 4. Σχηματική παράσταση της τυροσίνης και της 3-νιτροτυροσίνης.....	22
Σχήμα 5. Ο κεντρικός ρόλος του $NO$ στο σχηματισμό των RNS.....	23
Σχήμα 6. XNN και οξειδωτικό στρες. Ένας φαύλος κύκλος.....	34
Σχήμα 7. Ενεργοποίηση του λευκοκυττάρου και υπερπαραγωγή ROS και RNS.....	50
Σχήμα 8. Απομόνωση λεμφοκυττάρων από ανθρώπινο αίμα με τη βοήθεια του Histopaque.....	70



## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

	Σελ.
Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση της μεθόδου της ΑΚΘ.....	6
Εικόνα 2. Σχηματική παράσταση της μεθόδου της ΠΚ.....	8
Εικόνα 3. Σχηματισμοί του πυρηνικού DNA μετά από ανάλυση με την τεχνική comet assay .....	72
Εικόνα 4. Νίτρωση των πρωτεϊνών του πλάσματος των ασθενών σε ΑΚΘ....	78
Εικόνα 5. Επίδραση της προεπώασης με διθειονίδιο στις νιτροτυροσίνες του πλάσματος των ασθενών σε ΑΚΘ και των υγιών μαρτύρων (Υ). Σχεδόν πλήρη εξαφάνιση του σήματος.....	79
Εικόνα 6. Φάσματα νίτρωσης των πρωτεϊνών του πλάσματος των ασθενών σε ΑΚΘ και των υγιών ατόμων, όπως αυτά δίνονται με τη χρήση του προγράμματος 1D Image analysis software system.....	80
Εικόνα 7. Στατιστική ανάλυση των επιπέδων των νιτροτυροσινών των ασθενών σε ΑΚΘ και των υγιών μαρτύρων (Υ).....	81
Εικόνα 8. Νίτρωση των πρωτεϊνών του πλάσματος των ασθενών σε ΠΚ.....	83
Εικόνα 9. Στατιστική ανάλυση των επιπέδων των νιτροτυροσινών των ασθενών σε ΠΚ και των υγιών μαρτύρων (Υ).....	84
Εικόνα 10. Νίτρωση των πρωτεϊνών του πλάσματος των ασθενών με ΧΝΝ σταδίων 2-4.....	86
Εικόνα 11. Στατιστική ανάλυση των επιπέδων των νιτροτυροσινών των ασθενών με ΧΝΝ σταδίων 2-4 και των υγιών μαρτύρων (Υ).....	87
Εικόνα 12. Ταυτοποίηση των νιτροτυροσινών του πλάσματος των ασθενών σε ΑΚΘ και των υγιών μαρτύρων.....	90
Εικόνα 13. Καρβονυλίωση της αλβουμίνης του πλάσματος των ασθενών σε ΑΚΘ.....	92
Εικόνα 14. Ανίχνευση της ειδικότητας του αντισώματος δέσμευσης των καρβονυλίων μετά από προεπώαση του πλάσματος των ασθενών σε ΑΚΘ και των υγιών ατόμων (Υ) με το διάλυμα μάρτυρος. Δεν υπάρχει ανίχνευση σήματος.....	93
Εικόνα 15. Καρβονυλίωση της αλβουμίνης του πλάσματος των ασθενών σε ΠΚ.....	94



<b>Εικόνα 16.</b> Καρβονυλίωση της αλβουμίνης του πλάσματος των ασθενών με ΧΝΝ σταδίων 2-4.....	96
<b>Εικόνα 17.</b> Προσδιορισμός της βλάβης του DNA των λεμφοκυττάρων των ασθενών σε ΑΚΘ και των υγιών μαρτύρων (Υ) με τη μέθοδο comet assay.....	98
<b>Εικόνα 18.</b> Σχηματισμοί του πυρηνικού DNA των λεμφοκυττάρων των ασθενών σε ΑΚΘ μετά από ανάλυση με την τεχνική comet assay.....	99



## Α. ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ

### 1.1 Εισαγωγή

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ) αποτελεί ένα τεράστιο επιδημιολογικό πρόβλημα που κοστίζει πανάκριβα στις εθνικές οικονομίες αφού περισσότεροι από 1,6 εκατομμύρια ασθενείς υποβάλλονται σήμερα σε αιμοκάθαρση (ΑΚΘ) σε όλο τον κόσμο<sup>1,2</sup>. Οι περισσότεροι από τους ασθενείς αυτούς (90%) ζουν στις αναπτυγμένες χώρες, ενώ 112 κράτη, που αντιπροσωπεύουν ένα πληθυσμό περίπου 600 εκατομμυρίων, δεν έχουν τη δυνατότητα της ΑΚΘ, με αποτέλεσμα ένα εκατομμύριο ασθενείς να πεθαίνουν το χρόνο από νεφρική ανεπάρκεια.

Τόσο η συχνότητα όσο και ο επιπολασμός της νόσου βαίνουν αυξανόμενα παγκοσμίως, κατά 5-8 % το χρόνο<sup>1</sup>, ενώ υπολογίζεται ότι οι ασθενείς που θα υποβάλλονται σε ΑΚΘ σε όλο τον κόσμο, από 1,1 εκατομμύριο που ήταν το 2001, θα αυξηθούν σε 2 εκατομμύρια το 2010<sup>3</sup>. Το κόστος της ΑΚΘ στις ΗΠΑ είναι 66.000 δολάρια το χρόνο για κάθε ασθενή, ενώ υπολογίζεται ότι σε παγκόσμιο επίπεδο η δαπάνη για ΑΚΘ θα αυξηθεί από 70-75 δισεκατομμύρια δολάρια το 2001 σε πάνω από 1 τρισεκατομμύρια δολάρια το 2010<sup>1,3</sup>.

Τα τελευταία χρόνια ο όρος ΧΝΑ έχει αντικατασταθεί από τον όρο χρόνια νεφρική νόσος (ΧΝΝ), που θεωρείται πιο δόκιμος και αντιπροσωπευτικός και για το λόγο αυτό θα χρησιμοποιηθεί κατά την συγγραφή αυτής της μελέτης.

Τα δύο βασικά αίτια της ΧΝΝ είναι ο διαβήτης και η υπέρταση, που αντιπροσωπεύουν περίπου τα 2/3 των αιτιών. Ακολουθούν οι σπειραματονεφρίτιδες, οι χρόνιες διάμεσες νεφρίτιδες, οι πολυκυστικοί νεφροί, τα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος και η αποφρακτική ουροπάθεια. Σε ένα ικανό ποσοστό το αίτιο παραμένει άγνωστο, καθώς η υποκλινική εξέλιξη της νεφρικής νόσου μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψή της σε προχωρημένο στάδιο, στο οποίο η βιοψία νεφρού είναι και δυσχερής και δεν μπορεί να βοηθήσει στην ιστολογική ταυτοποίηση της νόσου.

Τα τελευταία χρόνια, από συσσωρευμένες μαρτυρίες που προέρχονται από επιδημιολογικές μελέτες, έγινε σαφές ότι η εξέλιξη της ΧΝΝ σε νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, με τη συνοδό αυξημένη καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα, είναι δυνατόν να προληφθεί ή τουλάχιστον να επιβραδυνθεί η εξέλιξή της, με την κατάλληλη θεραπευτική παρέμβαση που αφορά κυρίως την αντιμετώπιση των βασικών αιτιών της. Δυστυχώς όμως, παρόλο που τα πρώιμα στάδια της νεφρικής νόσου είναι δυνατόν να διαγνωστούν με απλές





εργαστηριακές εξετάσεις, η έλλειψη συμπτωμάτων έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη πιθανότητα έγκαιρης διάγνωσης και θεραπείας.

## 1.2 Ορισμός της ΧΝΝ και μέθοδοι εκτίμησης της νεφρικής λειτουργίας

Το 2000 το National Kidney Foundation (NKF) συνέστησε μια ομάδα εργασίας με σκοπό να συντάξει οδηγίες για τη ΧΝΝ που θα είχαν σκοπό να:

1. Ορίσουν τη ΧΝΝ και να ταξινομήσουν τα στάδια της
2. Να προτείνουν μεθόδους εκτίμησης της νεφρικής λειτουργίας
3. Να συσχετίσουν τα επίπεδα της νεφρικής λειτουργίας με τις διάφορες επιπλοκές της ΧΝΝ και
4. Να προσδιορίσουν παράγοντες κινδύνου που επιδρούν στην απώλεια της νεφρικής λειτουργίας και στην εμφάνιση της καρδιαγγειακής νόσου της ΧΝΝ

Οι κατευθυντήριες οδηγίες που συντάχθηκαν εξετάστηκαν από διάφορους επιλεγμένους οργανισμούς και φορείς ειδικών και εγκρίθηκαν από το Board of Directors του NKF το 2002<sup>4</sup>.

Σύμφωνα, λοιπόν, με τις N/DOQI οδηγίες ως ΧΝΝ ορίζονται οι καταστάσεις εκείνες που προσβάλλουν τον νεφρό και είναι δυνατό να οδηγήσουν σε προοδευτική απώλεια της νεφρικής λειτουργίας ή σε επιπλοκές που απορρέουν από την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Ως εκ τούτου ΧΝΝ ορίζεται η παρουσία νεφρικής βλάβης ή έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας για τρεις μήνες ή περισσότερο, ανεξάρτητα από τη διάγνωση της υποκείμενης πρωτοπαθούς νόσου.

Πιο αναλυτικά, ένας λειτουργικός ορισμός της ΧΝΝ πρέπει να περιλαμβάνει τα παρακάτω κριτήρια (Πίνακας 1):

### Πίνακας 1. Ορισμός της ΧΝΝ – Κριτήρια

1. Νεφρική βλάβη για περισσότερο από 3 μήνες, όπως αυτή ορίζεται από λειτουργικές ή δομικές ανωμαλίες του νεφρού με ή χωρίς έκπτωση του GFR, πιστοποιημένη με :
  - Ιστοπαθολογικές ανωμαλίες, ή
  - Δείκτες νεφρικής βλάβης, συμπεριλαμβανομένων των διαταραχών στη σύσταση του αίματος ή των ούρων ή βλαβών στις απεικονιστικές μεθόδους
2. GFR <60 mL/min/1.73m<sup>2</sup> για περισσότερο από 3 μήνες, με ή χωρίς νεφρική βλάβη



Ο GFR (Glomerular Filtration Rate, ρυθμός σπειραματικής διήθησης), χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της νεφρικής λειτουργίας και αντιπροσωπεύει την ποσότητα του, φυσιολογικά ελεύθερου πρωτεϊνών, υπερδιηθήματος που σχηματίζεται σε ένα λεπτό από το πέρασμα του αίματος και από τους δύο νεφρούς. Ο προσδιορισμός του GFR βασίζεται κυρίως στην κρεατινίνη του ορού. Μελέτες, όμως, έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της κρεατινίνης του ορού στο γενικό πληθυσμό παρουσιάζουν διακυμάνσεις έως και 25%<sup>5</sup>, καθώς η τιμή της εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το φύλο, η ηλικία, η φυλή, η μυϊκή μάζα, ο χρόνος της εξέτασης και η διαίτα. Έτσι, φαίνεται ότι η εκτίμηση του GFR πρέπει να γίνεται με την χρήση εξισώσεων που λαμβάνουν υπόψη όλους αυτούς τους παράγοντες<sup>6</sup>. Υπάρχουν περίπου 25 διαφορετικές εξισώσεις για την εκτίμηση του GFR<sup>7</sup>. Στην κλινική πράξη οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι η εξίσωση Cockcroft-Gault (CG) και η εξίσωση που προέκυψε από τη μελέτη Modification of Diet in Renal Disease (MDRD)<sup>6-9</sup> (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Εξισώσεις προσδιορισμού του GFR με βάση την κρεατινίνη ορού	
<i>Cockcroft-Gault</i>	$(140 - \text{ηλικία}) \times \text{βάρος}/72 \times S_{cr}$ (x 0.85 για γυναίκες)
<i>MDRD 1</i>	$170 \times S_{cr}^{-0.999} \times \text{ηλικία}^{-0.176} \times (0.762 \text{ για γυναίκες}) \times (1.180 \text{ νέγρος}) \times S_u^{-0.170}$
<i>MDRD 2</i>	$186 \times S_{cr}^{-1.154} \times \text{ηλικία}^{-0.203} \times (1.212 \text{ νέγρος}) \times (0.742 \text{ για γυναίκα})$

Scr: συγκέντρωση κρεατινίνης ορού, Su: συγκέντρωση ουρίας ορού

Οι περισσότεροι μελετητές συμφωνούν ότι ο τύπος MDRD πλεονεκτεί έναντι του τύπου CG, καθώς λαμβάνει υπόψη την επιφάνεια σώματος και τη φυλή του ασθενούς.

### 1.3 Στάδια της ΧΝΝ

Η ταξινόμηση της ΧΝΝ σε 5 στάδια από το K/DOQI έγινε δεκτή με ενθουσιασμό καθώς καθιέρωσε διεθνώς μία τυποποιημένη διαίρεση βασισμένη στα επίπεδα της νεφρικής λειτουργίας<sup>4</sup>. Στον πίνακα 3 φαίνεται η ταξινόμηση των σταδίων της ΧΝΝ με τον GFR, όπως αυτή υπολογίστηκε με τον τύπο της MDRD.



Πίνακας 3. Στάδια της ΧΝΝ		
Στάδιο	Περιγραφή	GFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )
1	Νεφρική βλάβη με φυσιολογική ή ↑ GFR	≥90
2	Νεφρική βλάβη με ήπια ↓ GFR	60-89
3	Μέτρια ↓ GFR	30-59
4	Βαριά ↓ GFR	15-29
5	Νεφρική ανεπάρκεια	<15 ή εξωνεφρική κάθαρση

Από την ταξινόμηση αυτή γίνεται φανερό ότι ένας αριθμός ασθενών με ΧΝΝ έχουν φυσιολογικό GFR (στάδιο 1). Από τη στιγμή, όμως, που εγκαθίσταται η ΧΝΝ πιστεύεται ότι αργά ή γρήγορα εξελίσσεται σε τελικό στάδιο ΧΝΑ. Ωστόσο, είναι εξαιρετικά σπάνιες οι διαχρονικές μελέτες που παρακολούθησαν τη φυσική εξέλιξη της ΧΝΝ στα διάφορα στάδιά της και από τα αποτελέσματά τους δεν συνάγεται ότι το ένα στάδιο αποτελεί βιολογική συνέχεια του προηγούμενου σταδίου. Πιο συγκεκριμένα, οι γνώσεις μας για τη φυσική εξέλιξη του σταδίου 1 και 2 της ΧΝΝ είναι εξαιρετικά περιορισμένες γιατί τα στάδια αυτά διαδράμουν ασυμπτωματικά και συνεπώς σπανίως παραπέμπονται για εκτίμηση σε νεφρολόγο. Έτσι, είναι άγνωστο σήμερα τι ποσοστό ασθενών με στάδιο 1 και 2 ΧΝΝ θα καταλήξουν σε τελικό στάδιο ΧΝΑ. Όσον αφορά τα προχωρημένα στάδια 3-5 της ΧΝΝ, τα δεδομένα στη βιβλιογραφία επισημαίνουν ότι οι ασθενείς αυτοί καταλήγουν σε θεραπεία υποκατάστασης. Παρόλα αυτά, μελέτες έδειξαν ότι ένα σημαντικό ποσοστό αυτών των ασθενών μπορεί να διατηρήσει σταθερή νεφρική λειτουργία. Μία μελέτη στο Sheffield έδειξε ότι σε ένα ποσοστό 27%, 34% και 38% των ασθενών με στάδιο 3, 4 και 5 ΧΝΝ δεν επιδεινώθηκε η νεφρική λειτουργία σε μια διάρκεια παρακολούθησης 5 ετών<sup>1</sup>. Συνεπώς απαιτούνται μεγάλες, καλά σχεδιασμένες, προοπτικές μελέτες προκειμένου να διευκρινισθεί η φυσική εξέλιξη της ΧΝΝ και οι παθοφυσιολογικές μεταβολές που αφορούν αυτή την



εξέλιξη. Επίσης, η μελέτη Kaser Permanente, που πραγματοποιήθηκε με 30000 άτομα με GFR κάτω από 90 ml/min έδειξε ότι μέσα σε μια πενταετία ποσοστό 1,1% 1,3% και 19,9% των ατόμων με στάδιο 2, 3 και 4 αντίστοιχα κατέληξε σε θεραπεία υποκατάστασης, ενώ το ποσοστό των ασθενών που πέθαναν ήταν 19,5%, 24,3% και 45,7% για το ίδιο χρονικό διάστημα και για τα ίδια στάδια<sup>10</sup>. Συνεπώς, ακόμη και για τα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ, ο θάνατος είναι πολύ πιο συχνός συγκριτικά με την εμφάνιση τελικού σταδίου ΧΝΑ. Αυτό το εύρημα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι στην ΑΚΘ εντάσσονται μόνο οι ασθενείς που είναι κατάλληλοι για θεραπεία, δείχνει ότι ο αριθμός των ασθενών που είναι καταγεγραμμένοι στα Αρχεία Καταγραφής Νεφροπαθών (Registries) και υποβάλλονται σε θεραπεία υποκατάστασης δεν αντιπροσωπεύει με ακρίβεια το τεράστιο επιδημιολογικό πρόβλημα της ΧΝΝ.

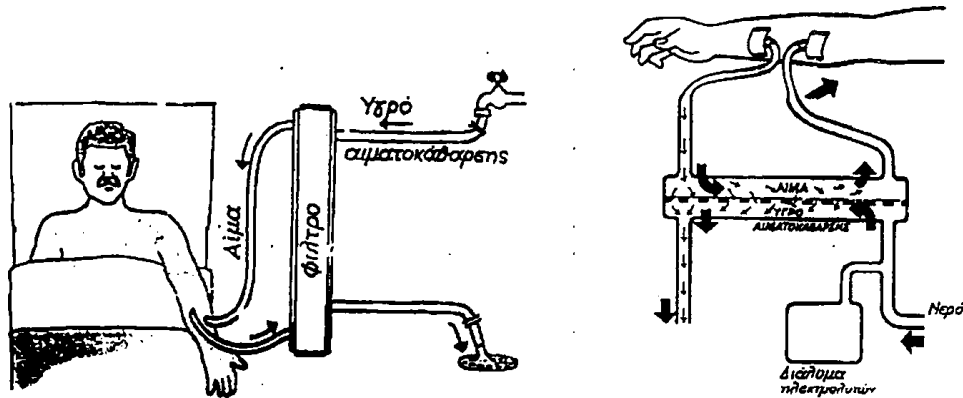
#### 1.4 Μέθοδοι υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας

Στα τελικά στάδια ΧΝΝ, όταν πλέον ο νεφρός έχει χάσει το 85-90% της νεφρικής του λειτουργίας, ο ασθενής είναι υποψήφιος να ενταχθεί σε κάποια από τις μεθόδους υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας. Δύο είναι οι βασικές μέθοδοι: η ΑΚΘ και η περιτοναϊκή κάθαρση (ΠΚ). Σκοπός και των δύο μεθόδων είναι η διατήρηση του ασθενούς στη ζωή. Αυτός ο σκοπός επιτυγχάνεται με τη μερική αναπλήρωση των φυσιολογικών λειτουργιών του νεφρού που έχουν να κάνουν με την αποβολή άχρηστων τοξικών ουσιών, τη διατήρηση της ομοιοστασίας των ηλεκτρολυτών και την αποβολή της περίσσειας αλατιού και νερού με σκοπό την ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Η δυνατότητα όμως του φυσιολογικού νεφρού να παράγει ερυθροποιητίνη και να συμβάλλει στο σχηματισμό της τελικής μορφής της βιταμίνης D, σίγουρα δεν μπορεί να αναπληρωθεί. Τα κριτήρια επιλογής της κατάλληλης μεθόδου για τον κάθε ασθενή είναι τόσο ιατρικά όσο και κοινωνικά.

##### 1.4.1 Αιμοκάθαρση

Η ΑΚΘ πραγματοποιείται σε εξειδικευμένες μονάδες στις οποίες πρέπει να προσέρχεται ο ασθενής 3 φορές την εβδομάδα για 4-5 ώρες, ανάλογα με τις ανάγκες του. Η όλη διαδικασία επιτυγχάνεται με την κυκλοφορία του αίματος στον τεχνητό νεφρό ο οποίος αποτελείται από τρία κύρια μέρη: το φίλτρο αιμοκάθαρσης, το μηχάνημα αιμοκάθαρσης και το σύστημα παρασκευής και τροφοδοσίας του υγρού αιμοκάθαρσης. Ειδικές σωληνώσεις χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά του αίματος από τον ασθενή στο φίλτρο και αντίστροφα,

ενώ με άλλες σωληνώσεις μεταφέρεται το υγρό αιμοκάθαρσης προς το φίλτρο και από εκεί σε αποχέτευση (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σχηματική παράσταση της μεθόδου της ΑΚΘ

Το φίλτρο ΑΚΘ στεγάζει και στηρίζει τις μεμβράνες της ΑΚΘ. Έτσι, κατά τη διάρκεια της ΑΚΘ, μέσα στο φίλτρο υπάρχουν και κυκλοφορούν αντιπαράλληλα δύο διαλύματα (αίμα-υγρό αιμοκάθαρσης), τα οποία χωρίζονται μεταξύ τους από τις ημιδιαπερατές μεμβράνες αιμοκάθαρσης. Αποτέλεσμα είναι η απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών από το αίμα του ασθενούς, κυρίως με τις μεθόδους της απλής διάχυσης και της υπερδιήθησης (εικόνα 1).

### Μεμβράνες αιμοκάθαρσης

Οι ημιδιαπερατές μεμβράνες αιμοκάθαρσης λειτουργούν σαν ένα είδος «κόσκινου»: δεν φέρουν ηλεκτρικά φορτία και έχουν πόρους μέσα από τους οποίους γίνεται η μετακίνηση των διαλυτών ουσιών. Διαλυτές ουσίες με υψηλό μοριακό βάρος (ΜΒ) διέρχονται βραδύτερα ή καθόλου διαμέσου των μεμβρανών, σε αντίθεση με ουσίες χαμηλού ΜΒ που διέρχονται ευκολότερα και ταχύτερα από τις μεμβράνες αιμοκάθαρσης. Η ιδανική μεμβράνη πρέπει να επιτρέπει τη διέλευση σε κάθε άχρηστη διαλυτή ουσία, εμποδίζοντας συγχρόνως τη διέλευση σε κάθε χρήσιμο στοιχείο, ενώ πρέπει να είναι απόλυτα συμβατή με κάθε κυτταρικό και χημικό στοιχείο του αίματος.

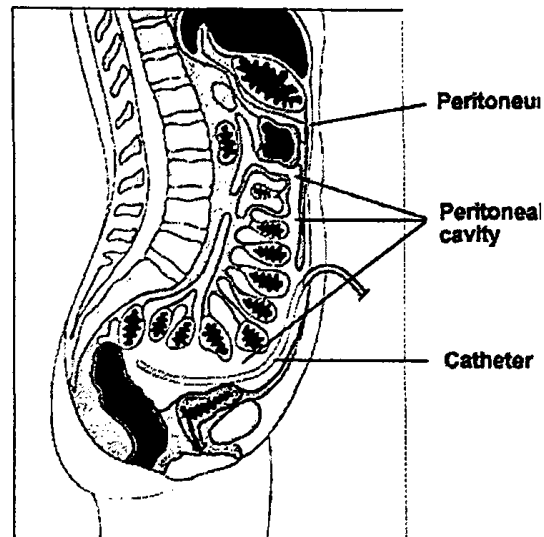
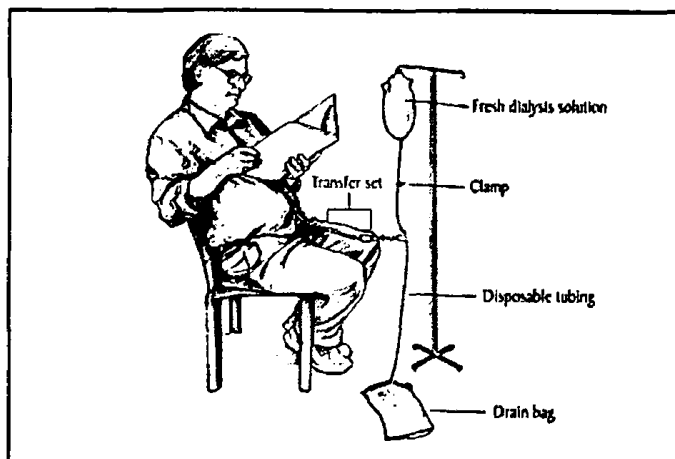


Η σημερινή παρουσία διαφόρων τύπων μεμβρανών αιμοκάθαρσης στηρίζεται κυρίως στην εμπειρία που αποκτήθηκε από την ευρεία χρήση των μεμβρανών από κυτταρίνη (cellulose). Η κυτταρίνη είναι πολυσακχαρίτης, ο οποίος, ανάλογα με τη μέθοδο επεξεργασίας του, μετατρέπεται σε διαφορετικό υλικό, που χρησιμοποιείται για την κατασκευή μεμβρανών. Οι πρώτες μεμβράνες αιμοκάθαρσης που παρασκευάστηκαν από κυτταρίνη είναι η σελλοφάνη (cellorhane) και η κουπροφάνη (cuprophane), ενώ νεότερες μεμβράνες με βάση την κυτταρίνη είναι η οξική κυτταρίνη (cellulose acetate) και η αναγεννημένη κυτταρίνη (regenerated cellulose). Όλες οι μεμβράνες αυτές παρουσιάζουν, ανάλογα με τον τρόπο επεξεργασίας τους, διαφορές που αφορούν τη χημική σύνθεση, τη μορφολογία και φυσικά την απόδοσή τους. Έτσι, η διέλευση των ουσιών κατά την ΑΚΘ ποικίλει από μεμβράνη σε μεμβράνη. Η κουπροφάνη, για παράδειγμα, παρουσιάζει υψηλότερο ποσοστό διάχυσης στις μικρού ΜΒ ουσίες σε σύγκριση με τη σελλοφάνη. Οι μεμβράνες, επίσης, από οξική κυτταρίνη διεγείρουν το σύστημα του συμπληρώματος λιγότερο από την κουπροφάνη, ενώ ακόμη εμφανίζουν και υψηλότερο βαθμό διάχυσης και υπερδιήθησης (κυρίως στις μέσου ΜΒ ουσίες) από τις συμβατικές μεμβράνες κουπροφάνης. Τα τελευταία χρόνια έχει καταβληθεί σημαντική προσπάθεια στη βελτίωση της απόδοσης αλλά και της βιοσυμβατότητας των μεμβρανών αιμοκάθαρσης. Ιδιαίτερη βαρύτητα έχει δοθεί στη βελτίωση της διάχυσης των ενδιάμεσου ΜΒ ουσιών. Έτσι, έχουν κατασκευαστεί νέες μεμβράνες, φυσικές και συνθετικές, που δεν έχουν καμία σχέση με την κυτταρίνη, όπως οι μεμβράνες από πολυακρυλονιτρίλη, πολυαμίδη, πολυμεθυλακρυλικό κ.α., οι οποίες και έχουν δώσει άλλη διάσταση στη θεραπεία με ΑΚΘ.

#### 1.4.2 Περιτοναϊκή κάθαρση

Σε αντίθεση με την ΑΚΘ, η ΠΚ είναι μια μέθοδος υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας που επιτελείται στο σπίτι, από τον ίδιο τον ασθενή, ο οποίος προσέρχεται στο νοσοκομείο μόνο μια φορά τον μήνα για κλινική εκτίμηση και εργαστηριακές εξετάσεις. Η μέθοδος επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ενός καθετήρα που τοποθετείται στην περιτοναϊκή κοιλότητα χειρουργικά, διαμέσου του οποίου ο ασθενής, 3-4 φορές τη ημέρα, κάνει αλλαγές κατάλληλων διαλυμάτων, κυρίως δεξτρόζης (εικόνα 2). Στη μέθοδο αυτή το ρόλο των μεμβρανών της ΑΚΘ τον επιτελεί η ίδια η περιτοναϊκή μεμβράνη, διαμέσου της οποίας, κυρίως ωσμωτικά, απομακρύνονται τα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού.





Εικόνα 2: Σχηματική παράσταση της μεθόδου της ΠΚ

Σίγουρα η μέθοδος παρουσιάζει κάποια πλεονεκτήματα συγκριτικά με την ΑΚΘ. Το βασικό είναι ότι παρέχει μια καλύτερη ποιότητα ζωής, αφού ο άρρωστος δεν είναι εξαρτημένος συνεχώς από το νοσοκομείο. Πέρα από την αρχική τοποθέτηση του καθετήρα, η διαδικασία της μεθόδου δεν περιλαμβάνει τίποτα άλλο το επεμβατικό και εν δυνάμει μολυσματικό. Η όλη διαδικασία της ΠΚ θεωρείται ότι είναι πιο βιοσυμβατή, καθώς το αίμα του ασθενούς δεν εκτίθεται στις «ξένες» μεμβράνες της ΑΚΘ, με αποτέλεσμα έτσι και τη μικρότερη ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος. Τέλος αποτελεί την μέθοδο εκείνη με την καλύτερη διατήρηση της υπολειπόμενης νεφρικής λειτουργίας<sup>11</sup>. Το βασικό μειονέκτημα όμως της μεθόδου είναι ο αυξημένος κίνδυνος περιτονίτιδας, ιδιαίτερα όταν ο ασθενής δεν έχει εκπαιδευτεί σωστά.

#### 1.4.3 Εκτίμηση της απόδοσης της κάθαρσης

Η ικανότητα των φίλτρων αιμοκάθαρσης και της περιτοναϊκής μεμβράνης να απομακρύνουν από το αίμα διαλυτές ουσίες και νερό πρέπει να προσδιορίζεται, για να μπορούμε να γνωρίζουμε και την επάρκεια της κάθαρσης. Για το λόγο αυτό έχει θεσπιστεί ο δείκτης κινητικής της ουρίας (Kt/V) ο οποίος αρχικά εφαρμόστηκε στην ΑΚΘ και λίγο αργότερα και στην ΠΚ. Οι αποδεκτές τιμές του kt/V για την ΑΚΘ είναι 1.0-1.2, ενώ για την ΠΚ είναι  $\geq 1.7$  (την εβδομάδα)<sup>12</sup>.

## **B. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ**

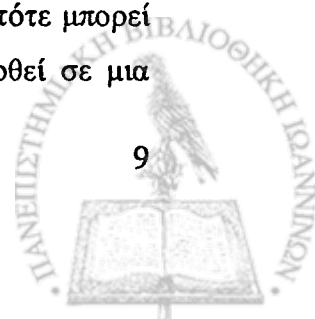
### **2.1 Εισαγωγή**

Η έρευνα γύρω από την βιοχημεία των ελευθέρων ριζών (free radicals), είχε αναπτυχθεί εδώ και αρκετές δεκαετίες σε τομείς, όπως η οργανική χημεία, η συντήρηση των τροφών, οι επιδράσεις ακτινοβολιών<sup>13</sup> καθώς και η βιομηχανία χρωμάτων και πλαστικών. Ο ρόλος τους όμως στη Βιολογία και την Ιατρική άρχισε να γίνεται κατανοητός και να μελετάται εντατικά τις τελευταίες 3-4 δεκαετίες.

Το 1954 ο Commoner έκανε την πρώτη αναφορά για την ύπαρξη ελευθέρων ριζών σε ένα βιολογικό σύστημα<sup>14</sup>, ενώ το 1956 η ομάδα του Gilbert<sup>15</sup> συσχέτισε τα τοξικά αποτελέσματα αυξημένων επιπέδων οξυγόνου στους αερόβιους οργανισμούς με τα αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Στη μελέτη αυτή προτάθηκε ότι η τοξικότητα του οξυγόνου οφείλεται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Χρειάστηκε όμως να περάσουν αρκετά χρόνια για να γίνει η ανακάλυψη, σε κύτταρα αερόβιων οργανισμών, ενζύμων όπως οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (Superoxide Dismutase, SOD) από τους Fridovich και McCord, το 1969<sup>16,17</sup>, ώστε να αρχίσει να γίνεται αντιληπτός ο σημαντικός ρόλος των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα.

Η ανάπτυξη της Βιοχημείας ως ξεχωριστής επιστήμης από τη Χημεία, η ανάπτυξη χρωματογραφικών και ηλεκτροφορητικών τεχνικών για τη μελέτη των κυτταρικών συστατικών, η ανάπτυξη ειδικών οργάνων (ηλεκτρονικοί παραμαγνητικοί συντονιστές, EPR ή ESR) για την άμεση ανίχνευση των ελευθέρων ριζών και η αλματώδης ανάπτυξη της Μοριακής Βιολογίας την τελευταία 20ετία, έπαιξαν καταλυτικό ρόλο στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους εμπλέκονται οι ελεύθερες ρίζες στις βασικές κυτταρικές λειτουργίες.

Τα τελευταία χρόνια έγινε κατανοητό ότι ελεύθερες ρίζες και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου παράγονται συνεχώς σε μικρές ποσότητες στο πλαίσιο των χημικών αντιδράσεων για την παραγωγή ενέργειας και τη διαφύλαξη της ομοιοστασίας του οργανισμού. Σε φυσιολογικές καταστάσεις φαίνεται να παίζουν ρόλο διαβιβαστή μηνύματος (signal transduction) σε κυτταρικό επίπεδο τόσο για την ανάπτυξη (κυτταρικός πολλαπλασιασμός) όσο και την αντίδραση σε εισβολείς (διεργασία φλεγμονής). Όταν όμως παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες και υπερκεράσουν τα αμυντικά συστήματα του οργανισμού, τότε μπορεί να είναι ιδιαίτερα τοξικές. Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών έχει αναφερθεί σε μια





σειρά από παθοφυσιολογικές καταστάσεις (έχουν αναφερθεί περισσότερες από 100), όπως σε σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης<sup>18</sup>, στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας, στο σηπτικό shock, σε αυτοάνοσα και χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωριασική αρθρίτιδα και ο συστηματικός ερυθρεμάτης λύκος<sup>19</sup>, σε νευροεκφυλιστικά νοσήματα, όπως στη νόσο του Parkinson και στη νόσο του Alzheimer<sup>20-24</sup>, στο σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων, στις πνευμονικές παθήσεις<sup>25</sup> που προκαλούνται από το μολυσμένο περιβάλλον, στις τοξικές ή και θεραπευτικές ιδιότητες διαφόρων φαρμάκων, στην τοξικότητα που προκαλείται από ακτινοβολίες, ενώ η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών φαίνεται ότι εμπλέκεται στην παθογένεια του καρκίνου<sup>26,27</sup> και της γήρανσης, καθώς και στην διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση).

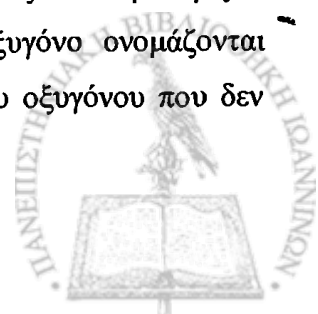
Στη συνέχεια του κεφαλαίου θα δοθεί ο ορισμός των ελευθέρων ριζών, θα παρουσιαστούν οι περισσότερες από αυτές, θα αναφερθούν οι συνέπειες από την υπερπαραγωγή τους καθώς και οι αμυντικοί μηχανισμοί του οργανισμού για τη διατήρηση της ομοιοστασίας.

## 2.2 Ορισμός

*Ελεύθερη ρίζα, ονομάζεται κάθε άτομο ή μόριο το οποίο έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του στοιβάδα, σε αντίθεση με τις μη-ελεύθερες ρίζες, οι εξωτερικές στοιβάδες των οποίων καλύπτονται από ζεύγη ηλεκτρονίων με αντίθετη στροφορμή (spin).*

Η παρουσία ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου προσδίδει συνήθως σε αυτές τις ενώσεις μεγάλη δραστηριότητα. Τα μόρια αυτά έχουν την τάση να αντιδρούν εύκολα με άλλα μόρια και να αποσπούν κυρίως ηλεκτρόνια για να συμπληρώσουν την εξωτερική τους στοιβάδα με ζεύγη ηλεκτρονίων και να μετατραπούν σε πιο σταθερές ενώσεις. Η απόσπαση όμως ενός ηλεκτρονίου από μια μη-ελεύθερη ρίζα, την μετατρέπει σε ελεύθερη ρίζα, η οποία με τη σειρά της μπορεί να αντιδράσει με άλλα μόρια και να σχηματίσει νέες ελεύθερες ρίζες. Με αυτό τον τρόπο προκαλούνται αλυσιδωτές αντιδράσεις, οι οποίες αν δεν αντιμετωπισθούν μπορούν να καταστρέψουν ολόκληρο το βιολογικό υλικό.

Το οξυγόνο είναι το κατ'έξοχόν ζωτικό στοιχείο για τους αερόβιους οργανισμούς. Η αφθονία του στα βιολογικά συστήματα σε συνδυασμό με την ικανότητά του να προσλαμβάνει μονά ηλεκτρόνια το καθιστούν το σημαντικότερο παράγοντα δημιουργίας ελευθέρων ριζών στις αερόβιες μορφές ζωής. Οι ελεύθερες ρίζες που περιέχουν οξυγόνο ονομάζονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Υπάρχουν όμως και ορισμένες ενώσεις του οξυγόνου που δεν



έχουν ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα, μπορούν όμως να συμμετέχουν σε τοξικές για τα κύτταρα αντιδράσεις ή στη δημιουργία των ελευθέρων ριζών. Οι ενώσεις αυτές, μαζί με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, ονομάζονται δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS).

Μια άλλη σημαντική κατηγορία δραστικών ουσιών είναι αυτές που περιέχουν άζωτο και ονομάζονται δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS)<sup>28</sup>.

### 2.3 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

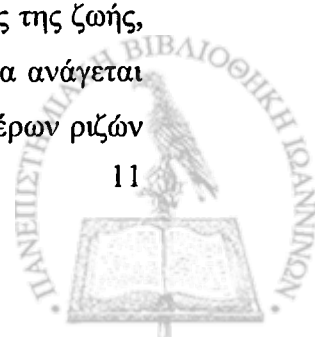
Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν από διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις μέσα στον οργανισμό<sup>29</sup>. Είναι συνέπεια αντιδράσεων οξειδοαναγωγής, όπου οξείδωση είναι η απομάκρυνση ηλεκτρονίων από ένα άτομο ή μόριο και αναγωγή η πρόσληψη ηλεκτρονίων. Αυτές οι αντιδράσεις μπορεί να είναι ενζυμικές ή μη ενζυμικές, με παρουσία όμως κάποιου μετάλλου μετάπτωσης. Οι πιο σημαντικές πηγές ελευθέρων ριζών είναι η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου κατά την αερόβια αναπνοή στα μιτοχόνδρια (σχήμα 1), η οξείδωση των κατεχολαμινών με την παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος με την παραγωγή του ανιόντος του σουπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) και η ενεργοποίηση των πολυμορφοπύρηνων και το ενδοθήλιο των αγγείων με την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου. Επίσης ελεύθερες ρίζες μπορεί να προκύψουν από διάσπαση ομοιοπολικού δεσμού, όπου τα ηλεκτρόνια που αποτελούσαν πριν το δεσμό μοιράζονται από ένα σε κάθε ομάδα.

Ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν ως απάντηση σε εξωγενή ερεθίσματα, όπως η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, φάρμακα και χημικά καρκινογόνα. Παράγονται επίσης σε συνθήκες ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (έμφραγμα μυοκαρδίου, μεταμοσχεύσεις, ανάταξη υποογκαιμικού shock), χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, τραύματα κ.α.

Σε πολλές περιπτώσεις, όμως, η παραγωγή των ελευθέρων ριζών αποτελεί απαραίτητο στοιχείο φυσιολογικών διεργασιών, αφού εξυπηρετούν βασικές ανάγκες του κυττάρου, όπως τη φαγοκυττάρωση, τη διαφοροποίηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και τη μεταγωγή σημάτων (signal transduction)<sup>30,31</sup>.

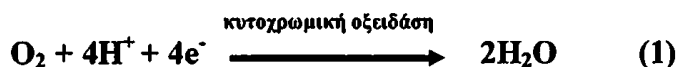
### 2.4 Δραστικές μορφές οξυγόνου

Παρά το γεγονός ότι το οξυγόνο αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα ύπαρξης της ζωής, η αφθονία του στα βιολογικά συστήματα σε συνδυασμό με την ικανότητά του να ανάγεται από μονά ηλεκτρόνια, το καθιστούν τον κυριότερο παράγοντα δημιουργίας ελευθέρων ριζών



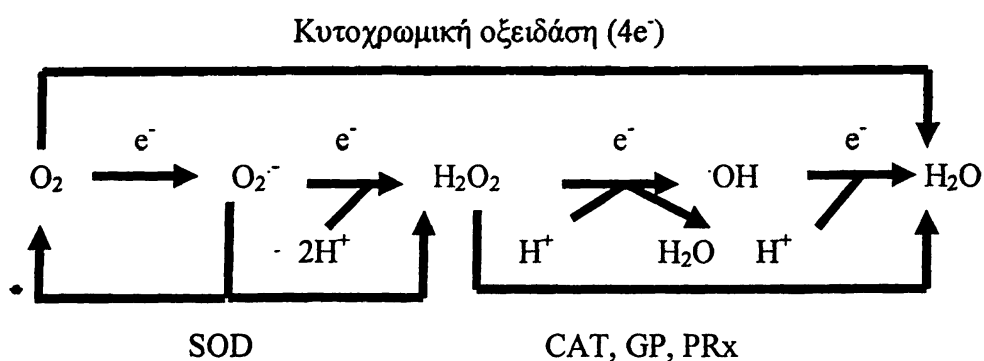
στις αερόβιες μορφές ζωής. Αυτός ο διπλός ρόλος του οξυγόνου, η κατανόηση του οποίου έγινε σχετικά πρόσφατα, αποκαλείται συνήθως το «παράδοξο του οξυγόνου».

Ο βασικός ρόλος του O<sub>2</sub> στη ζωή είναι να δρα ως αποδέκτης των ηλεκτρονίων που απελευθερώνονται από τις οξειδωτικές διεργασίες του καταβολισμού. Υπό φυσιολογικές συνθήκες το 98% του μοριακού οξυγόνου στα βιολογικά συστήματα ανάγεται σε νερό με τη βοήθεια του ενζύμου κυτοχρωμική οξειδάση, που αποτελεί το τελευταίο ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Το ένζυμο αυτό λαμβάνει 4 ηλεκτρόνια από 4 μόρια κυτοχρώματος c και τα χρησιμοποιεί για την αναγωγή ενός μορίου O<sub>2</sub> σε δύο μόρια H<sub>2</sub>O, διευκολύνοντας έτσι την παραγωγή ενέργειας υπό μορφή ATP (διαδικασία οξειδωτικής φωσφορύλιωσης) (αντίδραση 1).



Ένα μικρό όμως ποσοστό μοριακού οξυγόνου (περίπου το 2%) ανάγεται, ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, με μονά ηλεκτρόνια, όπως φαίνεται στο σχήμα 1, σχηματίζοντας ενδιάμεσες μορφές αναγωγής οξυγόνου. Με τις αντιδράσεις αυτές, ενδιάμεσες μορφές της αναγωγής του O<sub>2</sub>, όπως η O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, η HO<sub>2</sub><sup>•</sup> το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και η HO<sup>•</sup> σχηματίζονται συνεχώς στους αερόβιους οργανισμούς, ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Η αυξημένη παραγωγή αυτών των ενδιάμεσων μορφών της αναγωγής του οξυγόνου είναι υπεύθυνη για μια πλειάδα παθολογικών καταστάσεων στους αερόβιους οργανισμούς. Οι ενώσεις αυτές καλούνται συνολικά, όπως ήδη έχει αναφερθεί, Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS) ή Ενδιάμεσες Μορφές Αναγωγής του Οξυγόνου (Reactive Oxygen Intermediates) οι σημαντικότερες από τις οποίες αναφέρονται στον πίνακα 4. Όπως φαίνεται στον πίνακα 4, μερικές μόνο από τις ενώσεις αυτές είναι ελεύθερες ρίζες.





Σχήμα 1. Αναγωγή του μοριακού O<sub>2</sub> με μονά ηλεκτρόνια

Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αποτελεί, χωρίς αμφιβολία, τον κύριο παράγοντα των ενδιάμεσων μορφών αναγωγής του O<sub>2</sub>. Είναι ασθενές οξειδωτικό μόριο, αλλά παρουσία οξειδοαναγωγικά ενεργών ιόντων μετάλλων (κυρίως Fe<sup>+2</sup>) γίνεται αρκετά επικίνδυνο αφού δημιουργούνται ρίζες υδροξυλίου (OH<sup>·</sup>), οι οποίες είναι τόσο δραστικές ώστε αντιδρούν με οτιδήποτε βρεθεί δίπλα τους κατά τη στιγμή του σχηματισμού τους (αντίδραση Fenton).



**Αντίδραση Fenton**

Για το λόγο αυτό, όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια, υπάρχουν βασικά αντιοξειδωτικά συστήματα τα οποία είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε χαμηλές συγκεντρώσεις, όπως η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης.

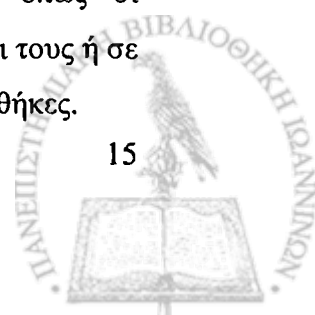
Πίνακας 4. Δραστικές μορφές οξυγόνου		
Ένωση	Χημικό σύμβολο	Ιδιότητες
<b>Ελεύθερες ρίζες</b>		
Ανιόν σουπεροξειδίου	$O_2^{\cdot -}$	Σχετικά καλό αναγωγικό, ασθενές οξειδωτικό
Ρίζα υδροξυλίου	$HO^{\cdot}$	Πολύ δραστικό σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Μικρή δυνατότητα διάχυσης
Υδροϋπεροξειδική ρίζα	$HO_2^{\cdot}$	Πιο ισχυρό οξειδωτικό και πιο υδρόφοβο από τη ρίζα του ανιόντος του σουπεροξειδίου. Μπορεί να προκαλέσει υπεροξείδωση των λιπιδίων των μεμβρανών
Ρίζα αλκοξειδίου	$RO^{\cdot}$	Ενδιάμεσης δραστικότητας οξειδωτικό
Ρίζα υπεροξειδίου	$ROO^{\cdot}$	Μικρότερη οξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την $HO^{\cdot}$ . Μεγαλύτερη δυνατότητα διάχυσης
<b>Μη-ελεύθερες ρίζες</b>		
Υπεροξείδιο του υδρογόνου	$H_2O_2$	Ασθενές οξειδωτικό (απουσία σιδήρου), ιδιαίτερα ικανό να διαπερνά τις μεμβράνες
Οργανικά υπεροξείδια	$ROOH$	Ασθενές οξειδωτικό (απουσία σιδήρου)
Μονήρες οξυγόνο	$^1O_2$	Ισχυρό οξειδωτικό
Υποχλωριώδες οξύ	$HOCl$	Ισχυρό οξειδωτικό

## 2.5 Δραστικές μορφές αζώτου

Στις δραστικές μορφές αζώτου (RNS) περιλαμβάνονται το μονοξειδίο ( $\text{NO}^\cdot$ ), και το διοξειδίο του αζώτου ( $\text{NO}_2^\cdot$ ) που έχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα και ως εκ τούτου είναι ελεύθερες ρίζες και τα οξέα  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ , και  $\text{N}_2\text{O}$  που δεν είναι ελεύθερες ρίζες.

Η ανακάλυψη του ρόλου του μονοξειδίου του αζώτου ( $\text{NO}^\cdot$ ) στους βιολογικούς οργανισμούς (1987) ήταν μια από τις σημαντικότερες επιτυχίες της επιστήμης των ελευθέρων ριζών, στον τομέα της κυτταρικής λειτουργίας και φυσιολογίας των βιολογικών οργανισμών. Το  $\text{NO}^\cdot$  είναι μικρό, άχρωμο σχετικά υδρόφοβο μόριο που διέρχεται διαμέσου των περισσότερων κυττάρων και ιστών χωρίς να αντιδρά ή να αναλώνεται. Η ταχύτατη διάχυσή του μεταξύ των κυττάρων είναι πολύ σημαντική ιδιότητα για την κατανόηση της βιολογικής του δράσης. Τα  $\text{NO}^\cdot$  αν και είναι ελεύθερη ρίζα, είναι σχετικά αδρανές. Μπορεί όμως να μετατραπεί σε ισχυρότερα οξειδωτικά μέσα διαμέσου αντιδράσεων με άλλα μόρια. Ο συνδυασμός των παραπάνω ιδιοτήτων του, δηλαδή της ικανότητάς του να διαπερνά τις βιολογικές μεμβράνες χωρίς να αντιδρά άμεσα με τα περισσότερα των μορίων τα οποία συναντά στο κύτταρο, το καθιστούν κατάλληλο ώστε να επιλεγεί από τη φύση για τη μετάδοση σημάτων, μεταξύ διαφορετικών ειδών κυττάρων, χωρίς την ενδιάμεση βοήθεια κλασικού τύπου υποδοχέων. Το  $\text{NO}^\cdot$  μπορεί να απελευθερωθεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα και σε ενεργοποιημένα μακροφάγα.

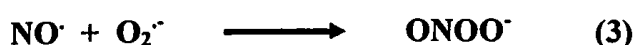
Στους ζώντες οργανισμούς το  $\text{NO}^\cdot$  σχηματίζεται από το αμινοξύ L-αργινίνη με μια αντίδραση που καταλύεται από τις συνθετάσες του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Τα ένζυμα αυτά μετατρέπουν την L-αργινίνη σε  $\text{NO}^\cdot$  και ένα άλλο αμινοξύ, την L-κιτρουλλίνη. Στην αντίδραση συμμετέχουν επίσης το NADPH και το  $\text{O}_2$  ως συνυποστρώματα σε μια όχι επακριβώς καθορισμένη στοιχειομετρία. Έχουν απομονωθεί και μελετηθεί τρία είδη NOS. Το πρώτο βρέθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα (eNOS), το δεύτερο στο νευρικό ιστό (nNOS), ενώ το τρίτο είναι ένα επαγόμενο ένζυμο, το οποίο δημιουργείται κάτω από ορισμένες συνθήκες (κυρίως σε συνθήκες οξειδωτικού στρες) σε μια σειρά από διαφορετικούς ιστούς (iNOS). Τα δύο πρώτα είδη εκφράζονται συνεχώς και η ενεργότητά τους ρυθμίζεται κυρίως από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση  $\text{Ca}^{2+}$ , ενώ η iNOS έχει συνεχώς συνδεδεμένο επάνω της ένα μόριο καλμοδουλίνης και ένα μόριο  $\text{Ca}^{2+}$  ώστε να μην χρειάζεται περαιτέρω αύξηση του ελεύθερου ενδοκυττάρου  $\text{Ca}^{2+}$ . Μια σειρά από διαφορετικούς διεγέρτες, όπως οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και οι κυτοκίνες (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  και άλλες) μόνοι τους ή σε συνδυασμό μπορούν και επάγουν την έκφραση της iNOS κάτω από ορισμένες συνθήκες.

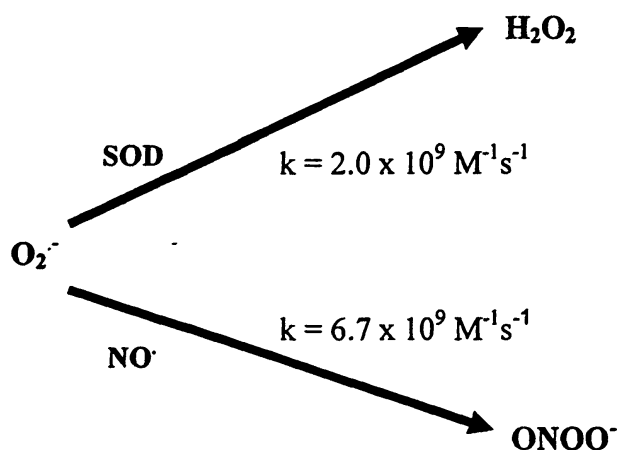


Οι αντιδράσεις του NO<sup>•</sup> οι οποίες σχετίζονται με τη βιολογική του σημασία είναι κατά κύριο λόγο τρεις: α) η αντίδρασή του με τη γουανυλική κυκλάση, η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταγωγή σημάτων, β) η απομάκρυνσή του διαμέσου της αντίδρασής του με την αιμοσφαιρίνη και γ) η αντίδρασή του με το O<sub>2</sub><sup>-</sup> με αποτέλεσμα τη δημιουργία του ONOO<sup>-</sup>, το οποίο φαίνεται ότι είναι ο κύριος διαμεσολαβητής της τοξικής δράσης του NO<sup>•</sup>. Αποτέλεσμα αυτών των αντιδράσεων είναι οι φυσιολογικοί ρόλοι και οι τοξικές δράσεις του NO<sup>•</sup>.

Επιστημονικές έρευνες έδειξαν ότι το NO<sup>•</sup> είναι ένας μικρής διάρκειας ζωής ενδοκυττάριος χημικός διαβιβαστής (μεσολαβητής σημάτων) και οι φυσιολογικοί του ρόλοι είναι καθοριστικοί για την πίεση του αίματος (αγγειοδιαστολή) αποτελώντας τον πιο γνωστό αγγειοδιασταλτικό παράγοντα (παλιότερα ήταν γνωστός ως παράγων χάλασης του ενδοθηλίου, endothelial derivative relaxing factor, EDRF), την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, τη σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων και την κεντρική και περιφερική νευροδιαβίβαση. Συμμετέχει επίσης στους μηχανισμούς της φλεγμονής, στην αντιμετώπιση βακτηριδίων, στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στην έκφραση διαφόρων γονιδίων<sup>32,33</sup>.

Η βιοσύνθεση σχετικά μικρών ποσοτήτων NO<sup>•</sup> από τις eNOS και nNOS φαίνεται ότι συσχετίζεται με τη φυσιολογική δράση του NO<sup>•</sup> στο αγγειακό, το νευρικό και το ανοσολογικό σύστημα. Η βιοσύνθεση όμως σχετικά μεγάλων ποσοτήτων NO<sup>•</sup> από την iNOS πιθανά να συσχετίζεται με την τοξικότητά του, η οποία έχει παρατηρηθεί όχι μόνο εναντίον ξένων εισβολέων αλλά και εναντίον κυττάρων του ίδιου οργανισμού<sup>34</sup>. Η κυτταροτοξικότητα αυτή δεν φαίνεται να οφείλεται απευθείας στο NO<sup>•</sup>, αλλά και σε δευτερεύοντα προϊόντα που προκύπτουν μετά την αντίδρασή του με άλλα μόρια. Το περοξυνιτρώδες (ONOO<sup>-</sup>), το οποίο σχηματίζεται από την αντίδραση NO<sup>•</sup> με το O<sub>2</sub><sup>-</sup>, θεωρείται από τα κύρια υπεύθυνα μόρια για την έκφραση της τοξικότητας του NO<sup>•</sup><sup>35</sup> (αντίδραση 3). Η σταθερά της αντίδρασης αυτής είναι τρεις φορές μεγαλύτερη από εκείνη της αντίδρασης μετατροπής του O<sub>2</sub><sup>-</sup> στο σχετικά αδρανές H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, η οποία καταλύεται από το ένζυμο δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD) (σχήμα 2).





Σχήμα 2. Εναλλακτικοί δρόμοι αντίδρασης του  $\text{O}_2^{\cdot -}$  μετά το σχηματισμό του

Η τύχη του  $\text{O}_2^{\cdot -}$  εξαρτάται από τις σταθερές των αντιδράσεων πολλαπλασιαζόμενες με τη συγκέντρωση της ένωσης με την οποία αντιδρά. Η συγκέντρωση του ενζύμου SOD στα περισσότερα είδη κυττάρων είναι της τάξεως των  $\mu\text{M}$  και θεωρείται γενικά ο κυριότερος δρόμος απομάκρυνσης του  $\text{O}_2^{\cdot -}$ . Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες οι συγκεντρώσεις του  $\text{NO}^{\cdot}$  π.χ. στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι της τάξεως των 5 με  $10 \text{ nM}$  και δεν φαίνεται να επηρεάζουν την αντίδραση του  $\text{O}_2^{\cdot -}$  με την SOD. Όταν όμως η συγκέντρωση του  $\text{NO}^{\cdot}$  ανέρχεται στα επίπεδα των  $\mu\text{M}$ , τότε μπορεί να ανταγωνιστεί αποτελεσματικά την SOD για το σχηματισμό  $\text{ONOO}^-$ . Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, στις οποίες τα επίπεδα του  $\text{O}_2^{\cdot -}$  είναι αυξημένα, το  $\text{NO}^{\cdot}$  δεν μπορεί να επιτελέσει τη φυσιολογική του λειτουργία (π.χ. χάλαση των αγγείων) λόγω της αντίδρασής του με το  $\text{O}_2^{\cdot -}$ .

## 2.6 Οξειδωτικό στρες

### 2.6.1. Ορισμός

Από όσα αναφέρθηκαν μέχρι στιγμής είναι εμφανές ότι η δημιουργία ROS και RNS στα κύτταρα των αερόβιων οργανισμών είναι συνεχής και λαμβάνει χώρα ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Η συσσώρευση όμως αυτών των ενώσεων θα είχε καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο. Για να καταφέρουν οι αερόβιοι οργανισμοί να επιζήσουν, έχουν αναπτύξει ένα σύστημα αμυντικών μηχανισμών που εξισορροπούν την παραγωγή των ROS



και RNS, απομακρύνοντας τες μόλις αυτές δημιουργηθούν. Υπάρχει δηλαδή μια λεπτή δυναμική ισορροπία ανάμεσα στην δημιουργία και την απομάκρυνση των ROS στα κύτταρα που καλείται «οξειδοαναγωγική ισορροπία».

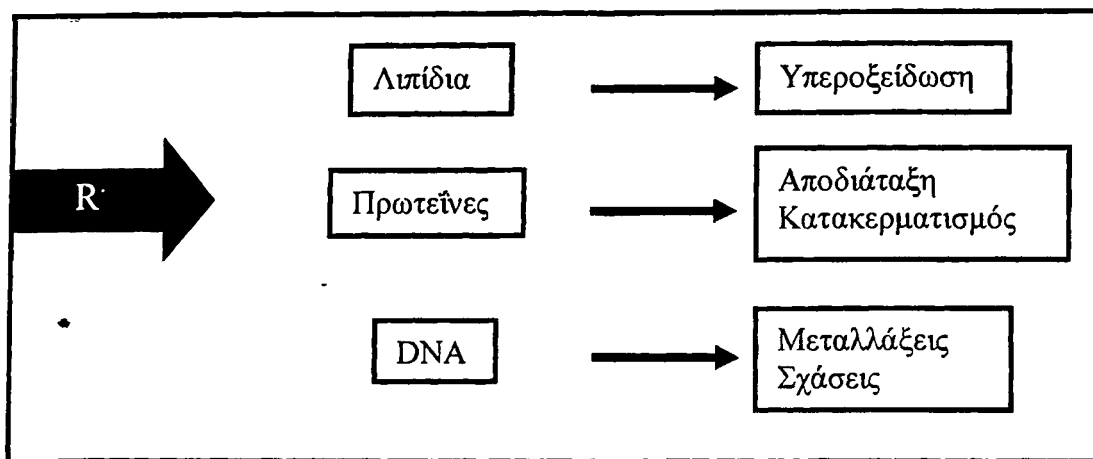
Η οξειδοαναγωγική ισορροπία δεν είναι η ίδια για όλα τα κύτταρα. Διαφορετικοί τύποι κυττάρων έχουν διαφορετικές ταχύτητες τόσο δημιουργίας όσο και απομάκρυνσης των ROS/RNS. Κατά συνέπεια, διαφορετικά είδη κυττάρων εκτίθενται σε διαφορετικά επίπεδα οξειδωτικών παραγόντων. Αλλά ακόμη και στα ίδια κύτταρα η ισορροπία αυτή μπορεί να αλλάζει κάτω από ορισμένες συνθήκες. Στις περιπτώσεις που η ισορροπία διαταράσσεται προς όφελος των οξειδωτικών παραγόντων, προκαλείται μια κατάσταση που είναι γνωστή ως οξειδωτικό στρες<sup>36</sup>.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προέλθει από μειωμένη σύνθεση ή λειτουργία ενδογενών αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών (π.χ. μεταλλάξεις) ή από ελλείψεις στη διαιτητική πρόσληψη των αντιοξειδωτικών ουσιών (π.χ. των βιταμινών C και E). Συνήθως όμως προκαλείται από την αυξημένη παραγωγή των ROS/RNS στα κύτταρα, η οποία μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η επίδραση ακτινοβολιών, η χορήγηση φαρμάκων, ο μεταβολισμός τοξικών ενώσεων κτλ. Η σημαντικότερη όμως πηγή πρόκλησης του οξειδωτικού στρες *in vivo* θεωρείται η ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων σε περίπτωση φλεγμονών. Τα ουδετερόφιλα που αποτελούν τον κυριότερο φαγοκυτταρικό πληθυσμό, όταν διεγείρονται, παράγουν σημαντικές ποσότητες  $O_2^{\cdot-}$ . Το  $O_2^{\cdot-}$  ανάγεται στη συνέχεια σε  $H_2O_2$  είτε από τη δράση της SOD είτε μη ενζυμικά. Αυτές οι δύο ROS, όπως ήδη αναφέρθηκε, εμφανίζουν χαμηλή δραστηριότητα. Έτσι για να αμυνθούν οι διάφοροι οργανισμοί αποτελεσματικά στους εισβολείς, εκλύουν, από κυτταροπλασματικά κυστίδια των φαγοκυττάρων, παράγοντες μεταξύ των οποίων και το ένζυμο μυελοπεροξειδάση (MPO), που χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το  $H_2O_2$ , οξειδώνει ιόντα χλωρίου σε υποχλωριώδες οξύ (HOCl), το οποίο είναι αρκετά ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας και συμβάλει στην άμυνα του οργανισμού.

## 2.7 Κυτταρικές καταστροφές από οξειδωτικό στρες

Σε περιπτώσεις στις οποίες οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται ενδοκυττάρια, μπορούν να αντιδράσουν και να προκαλέσουν τροποποιήσεις σε όλα τα βασικά κυτταρικά συστατικά (σχήμα 3). Οξειδωτική τροποποίηση των βασικών κυτταρικών συστατικών, όπως το DNA, οι πρωτεΐνες, οι μεμβράνες κλπ, οδηγούν σε τροποποιήσεις που είναι δυνατόν να επιφέρουν τον κυτταρικό θάνατο.





Σχήμα 3. Επιπτώσεις από την αντίδραση των ελευθέρων ριζών με τα βασικά κυτταρικά συστατικά

### 2.7.1. Λιπιδιακή υπεροξειδωση

Η δημιουργία μιας ελεύθερης ρίζας στα λιπίδια μπορεί να προκαλέσει την εκκίνηση μιας σειράς αντιδράσεων που οδηγούν στην υπεροξειδωση των λιπιδίων, η οποία συνήθως καλείται «λιπιδιακή υπεροξειδωση». Ο όρος λιπιδιακή υπεροξειδωση αναφέρεται κυρίως στην οξειδωτική βλάβη των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, αυτών δηλαδή που περιέχουν δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς άνθρακα στο μόριό τους ( $>C=C<$ ). Η λιπιδιακή υπεροξειδωση λαμβάνει χώρα φυσιολογικά, σε μικρό βαθμό, σε όλα τα κύτταρα και τους ιστούς<sup>37</sup>. Οι καταστάσεις που τη διεγείρουν είναι αρκετές, όπως η υποξία, η ισχαιμία-επαναιμάτωση, η τοξικότητα του χαλκού ή του σιδήρου και διαταραχές στο αντιοξειδωτικό σύστημα<sup>38</sup>. Ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών φαίνεται ότι είναι από τους βασικούς παράγοντες που πυροδοτούν το μηχανισμό της λιπιδιακής υπεροξειδωσης. Η αποδόμηση των λιπιδιακών υπεροξειδίων οδηγεί στο σχηματισμό διαφόρων τελικών προϊόντων από τα οποία τα πιο σημαντικά είναι οι αλδεΐδες, όπως η μηλονική διαλδεΐδη και οι υδροξυαλκενάλες (HNE: 4-hydroxy-2-trans-nonenal και HHE: trans-4-hydroxy-2-hexenal). Τα προϊόντα αυτά έχουν τη δυνατότητα αντιδρώντας με συγκεκριμένα αμινοξέα των πρωτεϊνών, όπως η λυσίνη, να οδηγούν στο σχηματισμό των τελικών προϊόντων προηγμένης λιπιδιακής υπεροξειδωσης (advanced lipoxydation ends products, ALEs), τα οποία παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση. Τροποποιήσεις των καταλοίπων λυσίνης στις πλάγιες αλυσίδες της απολιποπρωτεΐνης Β των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL), τις καθιστούν αναγνωρίσιμες από τους «υποδοχείς εκκαθαριστές» των μακροφάγων με αποτέλεσμα τη

συσσώρευσή τους στα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων, τα οποία θεωρούνται υπεύθυνα για την αθηροσκλήρωση. Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός αντίδρασης των ελευθέρων ριζών στα κύτταρα είναι με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στα φωσφολιπίδια και αποτελούν τα βασικά συστατικά των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών του κυττάρου. Τα αποτελέσματα της λιπιδιακής υπεροξειδωσης στις μεμβράνες, είναι κυρίως η μείωση της ρευστότητας, η μείωση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού, η αύξηση της διαπερατότητας, κυρίως σε μόρια όπως το  $\text{Ca}^{+2}$  και τα  $\text{H}^+$  και πιθανά η λύση του κυττάρου και η απελευθέρωση των συστατικών του. Παρατεταμένη λιπιδιακή υπεροξειδωση προκαλεί την ολική καταστροφή των βιολογικών μεμβρανών και το θάνατο των κυττάρων. Σημαντική προστασία στις μεμβράνες και τις λιποπρωτεΐνες από τη δράση των ελευθέρων ριζών παρέχει η λιπόφιλη βιταμίνη E ή α-τοκοφερόλη, που διακόπτει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών, αναστέλλοντας έτσι την λιπιδιακή υπεροξειδωση.

### 2.7.2 Βλάβες στο DNA

Το DNA και το RNA, αν και αποτελούν τα βασικότερα συστατικά των κυττάρων, φαίνεται πως είναι λιγότερο προστατευμένα και υπόκεινται πιο εύκολα σε βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται *in vivo*<sup>39</sup>. Οξειδωτικές τροποποιήσεις των νουκλεϊκών πολυμερών οδηγούν σε αναστολή της μεταγραφής και του διπλασιασμού του DNA, προκαλούν μεταλλάξεις και τελικά μπορούν να οδηγήσουν στο θάνατο του κυττάρου. Το ποσοστό των οξειδωτικών βλαβών στο DNA είναι ανιχνεύσιμο ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Υπολογίζεται ότι στο πυρηνικό DNA μια βάση στις 130.000 είναι τροποποιημένη οξειδωτικά. Στο μιτοχονδριακό DNA η βλάβη είναι αρκετά πιο υψηλή και υπολογίζεται σε μια τροποποιημένη βάση ανά 8.000. Η κύρια πηγή βλαβών στο DNA, πιστεύεται ότι είναι οι ρίζες υδροξυλίου ( $\text{OH}^{\cdot}$ ). Οι ρίζες αυτές είναι πάρα πολύ δραστικές με αποτέλεσμα να μην μπορούν να διαχυθούν, αλλά αντιδρούν με οτιδήποτε βρεθεί δίπλα τους τη στιγμή της δημιουργίας τους. Κατά συνέπεια το σημείο της δημιουργίας των  $\text{OH}^{\cdot}$  καθορίζει και την εξειδίκευση της δράση τους. Για παράδειγμα, αν οι  $\text{OH}^{\cdot}$  σχηματιστούν στο ενδοπλασματικό δίκτυο, είναι απίθανο να διαχυθούν και να προκαλέσουν βλάβη στο πυρηνικό DNA. Οι  $\text{OH}^{\cdot}$  για να προκαλέσουν βλάβη στο DNA είτε πρέπει να δημιουργηθούν πάνω στο DNA είτε, αν σχηματιστούν σε άλλα σημεία, πρέπει να προκαλέσουν τη δημιουργία δευτερευόντων μορίων τα οποία να διαχυθούν έως τον πυρήνα.

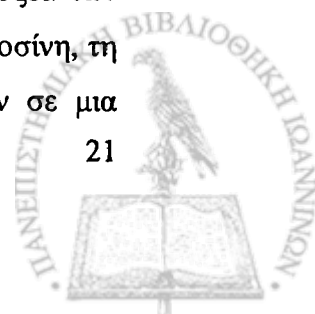


-Η οξειδωτική τροποποίηση στο DNA μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από διαφορετικά αποτελέσματα, όπως σχάση των μονών και διπλών αλυσίδων, ανταλλαγή αδελφών χρωματίδων, διασυνδέσεις τύπου DNA-DNA ή DNA-πρωτεΐνης και τροποποιήσεις των βάσεων του DNA<sup>40;41</sup>. Από τις βάσεις του DNA, οι πιο ευαίσθητες σε οξειδωτικές τροποποιήσεις είναι οι πυριμιδίνες κυτοσίνη και ειδικά η θυμίνη. Οι τροποποιημένες βάσεις, μπορούν να απομακρυνθούν από το DNA σχηματίζοντας έτσι απουρινικές ή απυριμιδινικές θέσεις. Επειδή οι αντιδράσεις ελευθέρων ριζών με το DNA είναι σχετικά μη ειδικές, ακόμη και ο φωσφοδιεστερικός δεσμός μπορεί να υποστεί βλάβες. Οι βλάβες αυτές μπορούν να οδηγήσουν σε σχάση της αλυσίδας σε ορισμένα σημεία και στο σχηματισμό μη τυπικών 3' και 5' άκρων (μη-3'-OH και μη-5'-PO<sub>4</sub>). Σε περιπτώσεις στις οποίες η συγκέντρωση ελευθέρων ριζών είναι υψηλή, είναι δυνατόν να προκύψουν σχάσεις στις διπλές αλυσίδες του DNA, οι οποίες είναι δυσκολότερο να επιδιορθωθούν, σε σύγκριση με τις σχάσεις στις μονές αλυσίδες. Εκτός από τις επιπτώσεις στις βάσεις και στην ριβόζη, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με τις πυρηνικές πρωτεΐνες, δημιουργώντας νέες ελεύθερες ρίζες, οι οποίες πολλές φορές μπορούν να συνδέονται ομοιοπολικά με το DNA (διασυνδέσεις DNA-πρωτεϊνών). Οι διασυνδέσεις αυτές είναι δυνατόν να εμποδίζουν το ξεδίπλωμα της χρωματίνης, την επιδιόρθωση του DNA και τις διαδικασίες σύνθεσης νέου DNA και RNA.

### 2.7.3 Οξείδωση πρωτεϊνών

Η βιολογική σημασία της οξειδωτικής βλάβης των πρωτεϊνών έχει γίνει πλήρως αντιληπτή μόλις τα τελευταία χρόνια<sup>42</sup>. Υψηλά επίπεδα ROS/RNS, με ή χωρίς διαταραχή της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας του οργανισμού, είναι υπεύθυνα για διαφόρων τύπου χημικές τροποποιήσεις σε επιρρεπείς πρωτεΐνες<sup>43</sup>. Οι τροποποιήσεις αυτές διακρίνονται σε αντιστρεπτές και μη αντιστρεπτές<sup>44</sup>. Στις μη αντιστρεπτές τροποποιήσεις ανήκουν η νίτρωση και η καρβονυλίωση που σχετίζονται με μόνιμες βλάβες της λειτουργίας των πρωτεϊνών, οι οποίες στη συνέχεια οδηγούνται είτε στην αποικοδόμηση<sup>42,45</sup> είτε στη κυτταροπλασματική συσσώρευσή τους, όπως συμβαίνει σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες<sup>46,47</sup>. Στις αναστρέψιμες τροποποιήσεις των πρωτεϊνών ανήκουν η νιτροσυλίωση και η γλυταθειονυλίωση, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην οξειδοαναγωγική ισορροπία.

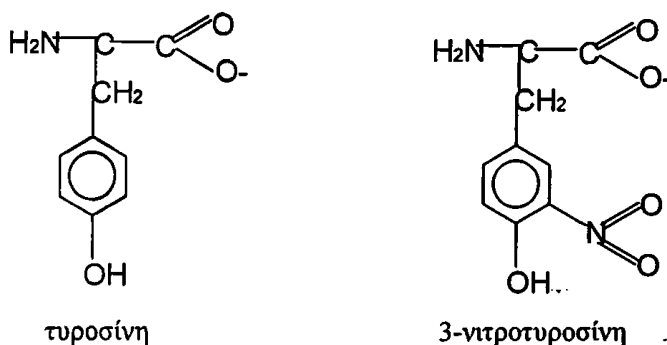
Οι ROS/RNS μπορούν να προσβάλουν και να τροποποιήσουν διάφορα αμινοξέα των πρωτεϊνών, με πιο ευαίσθητα την κυστεΐνη, τη μεθειονίνη, την τρυπτοφάνη, την τυροσίνη, τη φαινυλαλανίνη και την ιστιδίνη. Οι επιπτώσεις της επίδρασης ελευθέρων ριζών σε μια



συγκεκριμένη πρωτεΐνη εξαρτάται από την περιεκτικότητα της πρωτεΐνης σε αυτά τα αμινοξέα, από το πόσο σημαντικά είναι αυτά για τη δράση της πρωτεΐνης και από την ικανότητα των κυττάρων να διορθώσουν τις βλάβες στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη<sup>48</sup>. Οξειδωτική τροποποίηση ενζύμων, υποδοχέων ή πρωτεϊνών μεταγωγής του σήματος, έχει ως αποτέλεσμα διαταραχές στη γενική λειτουργία του οργανισμού. Επίσης, βλάβες σε πρωτεΐνες επιδιόρθωσης της μεταγραφής του DNA έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των μεταλλάξεων. Τέλος, οξειδωτικά τροποποιημένες πρωτεΐνες μπορεί να προκαλέσουν ανοσολογική απόκριση με αποτέλεσμα τη δημιουργία αντισωμάτων τα οποία πιθανόν να σχετίζονται με την αυτοανοσία. Επειδή η οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών και συγκεκριμένα η νίτρωση και η καρβονυλίωση, χρησιμοποιείται ως ένας από τους βασικούς δείκτες του οξειδωτικού στρες στην παρούσα μελέτη, παρουσιάζονται αναλυτικά στα παρακάτω κεφάλαια.

## 2.8 Νίτρωση πρωτεϊνών

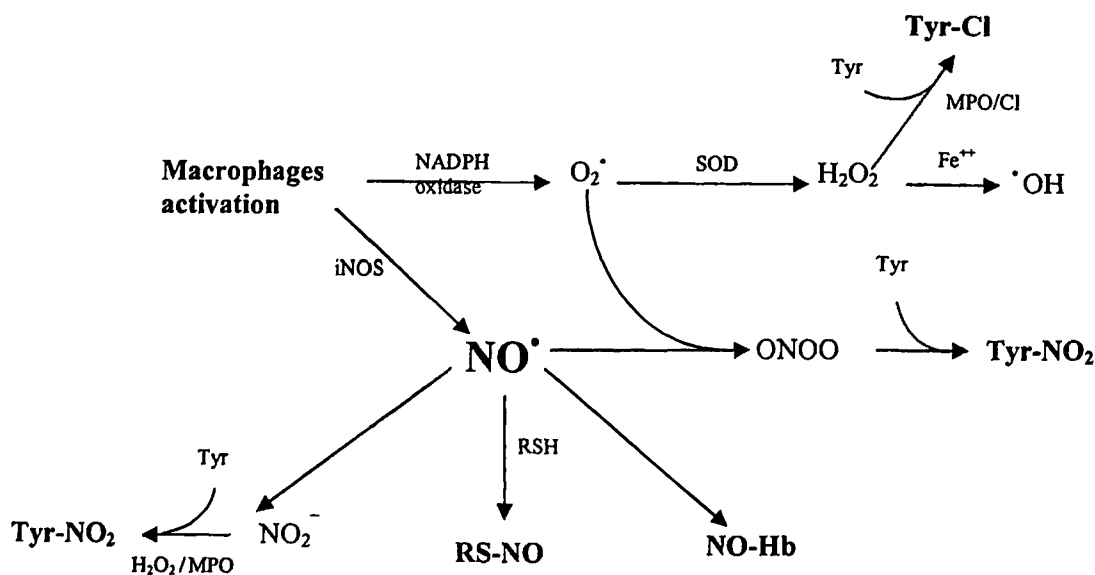
Η νίτρωση των τυροσινών είναι εκείνη η πρωτεϊνική τροποποίηση που προκύπτει από την προσθήκη μιας αμινοομάδας (-NO<sub>2</sub>) σε ένα από τους δύο ισοδύναμους ορθο- άνθρακες του αρωματικού δακτυλίου του υπολειμματος της τυροσίνης (σχήμα 4).



Σχήμα 4. Σχηματική παράσταση της τυροσίνης και της 3-νιτροτυροσίνης

Το NO<sup>·</sup> φαίνεται ότι κατέχει έναν κεντρικό, καθοριστικό ρόλο στο φαινόμενο της νίτρωσης των πρωτεϊνών. Όπως, όμως, έχει ήδη αναφερθεί, το NO<sup>·</sup>, αν και είναι ελεύθερη ρίζα, δεν είναι τόσο τοξικό ώστε να προκαλεί από μόνο του οξειδώσεις. Όταν όμως βρεθεί κάτω από κατάλληλες συνθήκες αντιδρά γρήγορα με άλλα μόρια με αποτέλεσμα το

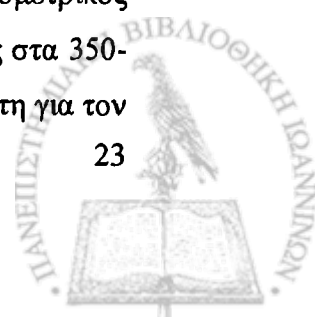
σχηματισμό δραστικών μορφών νίτρωσης<sup>49-51</sup>. Έτσι, παρουσία  $O_2^{\cdot-}$  έχουμε τον ταχύ σχηματισμό του περοξυνιδρούς ( $ONOO^{\cdot}$ ) (αντίδραση 3), το οποίο είναι τοξικό, αφού μπορεί να προκαλέσει την άμεση οξείδωση των πρωτεϊνών<sup>52;53</sup>. Άλλα μέσα νίτρωσης μπορούν να προέλθουν από την οξείδωση του νιτρώδους ( $NO_2^{\cdot}$ ) από τις περοξειδάσες (όπως η μυελοπεροξειδάση και η ηωσινιφιλική περοξειδάση) παρουσία  $H_2O_2$ <sup>54;55</sup>. Τέλος, ένας άλλος δρόμος που οδηγεί στο σχηματισμό μέσω νίτρωσης και που συνήθως παραβλέπεται, είναι η δημιουργία του νιτρώδους οξέος ( $HNO_2$ ) από την οξינוποίηση του  $NO_2^{\cdot}$ . Αν και η διαδικασία αυτή απαιτεί μια σημαντική πτώση του pH ( $pH < 6.0$ ), το νιτρώδες οξύ μπορεί να προκαλέσει νίτρωση των πρωτεϊνών με ένα αργό ρυθμό<sup>56;57</sup>. Συμπερασματικά φαίνεται ότι ένα πλήθος βιολογικών αντιδράσεων που πηγάζουν από το σχηματισμό του  $NO^{\cdot}$  μπορούν να θεωρηθούν υπεύθυνες για τη νίτρωση των τυροσινών στις πρωτεΐνες (σχήμα 5).



Σχήμα 5. Ο κεντρικός ρόλος του  $NO^{\cdot}$  στο σχηματισμό των RNS

### Ανίχνευση νιτροτυροσινών

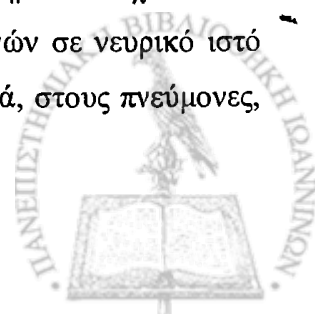
Πολλές είναι οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των 3-νιτροτυροσινών. Η πιο απλή από όλες θεωρείται ότι είναι ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός, αφού οι 3-νιτροτυροσίνες παρουσιάζουν ένα μέγιστο απορρόφησης στα 350-450nm, που εξαρτάται από το pH του δείγματος. Η μέθοδος αυτή θεωρείται αξιόπιστη για τον



ποσοτικό προσδιορισμό των 3-νιτροτυροσινών υπό την προϋπόθεση ότι το δείγμα είναι σχετικά καθαρό<sup>58</sup>. Με την πάροδο των ετών νέες αξιόπιστες και ακριβείς τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό των 3-νιτροτυροσινών *in vivo*, όπως η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography (HPLC)), με ηλεκτροχημική ανίχνευση (electrochemical (EC) detection) ή ανίχνευση με υπεριώδη ακτινοβολία (UV detection) και η Αέρια Χρωματογραφία-Φασματοσκοπία Μάζας (Gas Chromatography- Mass Spectrometry (GC-MS)), αλλά και ανοσοχημικές τεχνικές όπως η ανοσοιστοχημεία, η ανοσοκαθίζηση, η ανοσοαποτύπωση (Western blotting analysis) και η ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέθοδος (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA). Οι ανοσοχημικές τεχνικές που στηρίζονται στη χρησιμοποίηση αντισωμάτων, περιορίζονται στην ανίχνευση των 3-νιτροτυροσινών που βρίσκονται στις πρωτεΐνες είτε του πλάσματος είτε των ιστών ή ακόμη και στην ταυτοποίησή τους. Η ELISA, μάλιστα, παρέχει τη δυνατότητα και ενός απλού ημιποσοτικού προσδιορισμού των 3-νιτροτυροσινών, τόσο στα υγρά του σώματος όσο και στα ιστικά ομογενοποιημένα. Παρόλα αυτά, οι αναλυτικές τεχνικές (HPLC, GC-MS) θεωρούνται απαραίτητες για τον ποσοτικό προσδιορισμό τόσο των ελεύθερων 3-νιτροτυροσινών όσο και των 3-νιτροτυροσινών που αποτελούν μέρος των πρωτεϊνών. Η χρήση όμως των τεχνικών αυτών προϋποθέτει την υδρόλυση των πρωτεϊνών, η οποία γενικώς πραγματοποιείται κάτω από όξινες συνθήκες. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ψευδή αποτελέσματα αφού κάτω από όξινες συνθήκες και παρουσία  $\text{NO}_2^-$  στο δείγμα, είναι δυνατή η δημιουργία 3-νιτροτυροσινών<sup>59</sup>. Για να υπερκεραστούν τα εμπόδια αυτά που οδηγούν στην τεχνητή παραγωγή νιτροτυροσινών, πρέπει η υδρόλυση να γίνεται υπό αλκαλικές και όχι όξινες συνθήκες<sup>60</sup>. Οι διάφορες μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά την ευαισθησία και την ειδικότητά τους. Έτσι φαίνεται ότι ο συνδυασμός των αναλυτικών και των ανοσοχημικών τεχνικών θα ήταν η καλύτερη προσέγγιση, καθώς η κάθε μέθοδος συμπληρώνει την άλλη παρέχοντας έτσι πληροφορίες για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση των 3-νιτροτυροσινών, αλλά και το μέγεθος της νίτρωσης.

### ***Παρουσία 3-νιτροτυροσινών σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις***

Πέρα από την ανίχνευση 3-νιτροτυροσινών σε διάφορα νοσήματα, η παρουσία τους έγινε εμφανής και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αφού οι τεχνικές ανίχνευσής τους έχουν γίνει πιο ευαίσθητες. Πράγματι η χρήση αναλυτικών και ανοσοχημικών τεχνικών σε συνδυασμό οδήγησε στην ανίχνευση βασικών επιπέδων 3-νιτροτυροσινών σε νευρικό ιστό (εγκέφαλο, νωτιαίος μυελός, περιφερικά νεύρα), στα αγγεία, στην καρδιά, στους πνεύμονες,



στο ήπαρ, στους νεφρούς, το πάγκρεας, τους σκελετικούς μύες, το δέρμα, το στοματικό βλεννογόνο, το θύμο αδέν, τις ωοθήκες και τα σωματικά υγρά, όπως το πλάσμα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό<sup>61-64</sup>. Το μέγεθος της νίτρωσης που προσδιορίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ποικίλει και εξαρτάται από το είδος ή τον τύπο του ιστού ή του σωματικού υγρού. Έτσι διαφορές όσον αφορά τα επίπεδα των 3-νιτροτυροσινών έχουν εντοπιστεί όχι μόνο μεταξύ των διαφόρων ιστών, αλλά και μεταξύ διαφορετικών περιοχών του ίδιου ιστού. Για παράδειγμα στο νευρικό ιστό διαφορετικά είναι τα επίπεδα στον εγκέφαλο απ'ότι στον νωτιαίο μυελό.

Η νίτρωση, όμως, είναι ένα φαινόμενο που ιδιαίτερα έχει μελετηθεί σε διάφορα νοσήματα. Έχει αναφερθεί μια αύξηση κατά 2-10 φορές των 3-νιτροτυροσινών των πρωτεϊνών και κατά 1.5-2 φορές των ελεύθερων 3-νιτροτυροσινών τουλάχιστον σε 50 νοσήματα, ανάλογα βέβαια με το νόσημα και τον ιστό που μελετάται. Έτσι αυξημένα επίπεδα 3-νιτροτυροσινών έχουν ανιχνευτεί σε: αθηρωματικές πλάκες στεφανιαίων αγγείων<sup>65</sup>, σε ιστολογικά παρασκευάσματα νεογνών με σήψη ή αναπνευστική δυσχέρεια<sup>66;67</sup>, στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση<sup>68</sup>, στην πλάγια μυατροφική σκλήρυνση<sup>69;70</sup>, σε πλάκες της πολλαπλής σκλήρυνσης<sup>71</sup>, στη νόσο του Alzheimer<sup>72;73</sup>, σε απορριφθέντα νεφρικά μοσχεύματα<sup>74</sup>, σε σηπτικούς ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια<sup>75</sup>, σε φλεγμονώδους νόσους του εντέρου<sup>76</sup>, σε αρθρικό υγρό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα<sup>77</sup>, αλλά και σε διάφορες άλλες ασθένειες<sup>78</sup>. Ανοσοιστοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι κατά τη διάρκεια μιας παθολογικής κατάστασης η νίτρωση των πρωτεϊνών αφορά συγκεκριμένο τύπο κυττάρων, ανάλογα με τον ιστό που προσβάλλεται και το είδος του νοσήματος. Μερικές από τις πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί να υφίστανται νίτρωση σε διάφορα νοσήματα είναι η Mn SOD<sup>79</sup>, η σεουλοπλασμίνη<sup>80;81</sup>, η τρανσφερίνη<sup>80;81</sup>, ο αναστολέας της α<sub>1</sub>-πρωτεΐνης<sup>81</sup> και η β αλυσίδα του ινωδογόνου<sup>81</sup>.

Το γεγονός ότι συγκεκριμένες πρωτεΐνες σε συγκεκριμένους ιστούς, αλλά και συγκεκριμένα κύτταρα ιστών υφίστανται νίτρωση, αντανακλά το γεγονός ότι η νίτρωση είναι ένα εκλεκτικό φαινόμενο<sup>49;82</sup>. Παράγοντες οι οποίοι φαίνεται να επηρεάζουν αυτό το φαινόμενο είναι η εγγύτητα της πρωτεΐνης στο σημείο δημιουργίας των μέσων νίτρωσης, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και η περιεκτικότητά της σε υπολείμματα τυροσίνης, καθώς και η ύπαρξη ενός ευνοϊκού για νίτρωση περιβάλλοντος που περιστοιχίζει τα αμινοξέα τυροσίνης της πρωτεΐνης (μακριά από υπολείμματα κυστεΐνης ή μεθειονίνης που αποτελούν εναλλακτικούς στόχους νίτρωσης, κοντά σε αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα, αλλά και σε δομή βρόγχου με παρουσία αμινοξέων γλυκίνης ή προλίνης).





### **Κλινική συσχέτιση και βιολογική σημασία του φαινομένου της νίτρωσης**

Μια σειρά μελετών δείχνουν ότι η νίτρωση των πρωτεϊνών, τουλάχιστον *in vitro* και σε κυτταρικές σειρές, μπορεί να αλλάξει σημαντικά την λειτουργία των πρωτεϊνών, να επηρεάσει την ανοσολογική ανταπόκριση, αλλά και πιθανά να παίζει σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες μεταγωγής σημάτων<sup>74;78;83</sup>. Παρόλα αυτά ένα μεγάλος αριθμός από αναπάντητα ερωτήματα παραμένουν σχετικά με τη βιολογική σημασία των ευρημάτων αυτών *in vivo*. Μελέτες, ωστόσο, έχουν δείξει ότι η νίτρωση των πρωτεϊνών μπορεί να αλλάξει σημαντικά τη λειτουργία τους *in vivo*, όπως έχει φανεί με την τροποποίηση της δράσης της σερουλοπλασμίνης, του  $\alpha_1$  αναστολέα της πρωτεϊνάσης, αλλά και του ινδογόνου, επηρεάζοντας έτσι βασικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως η ομοιοστασία των μετάλλων, η πρωτεόλυση και η πήξη<sup>81</sup>.

Ένα επίσης από τα πεδία που απαιτεί περαιτέρω έρευνα είναι και ο ρόλος της νίτρωσης των τυροσινών στην ανοσολογική ανταπόκριση. Φαίνεται ότι τα μακροφάγα περιέχουν μεγάλα ποσά 3-νιτροτυροσινών. Η παρουσία αυξημένων ποσών μπορεί να οφείλεται στην παραγωγή διαφόρων μέσων νίτρωσης από τα μακροφάγα, αλλά κυρίως στη φαγοκύτωση των 3-νιτροτυροσινών σε μια προσπάθεια απομάκρυνσή τους από τις περιοχές της φλεγμονής. Πρόσφατα, μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι η νίτρωση των κυτοκινών, όπως της IL-5 ή της IL-8, μεταβάλλει την ανοσολογική ανταπόκριση<sup>84</sup>.

Τέλος, υπάρχουν αρκετά ενδιαφέροντα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η νίτρωση είναι μια αντιστρεπτή διεργασία, ένα εύρημα πολύ βασικό όσον αφορά τον ενδεχόμενο ρόλο της φυσιολογικής αυτής διεργασίας στη μεταγωγή του σήματος. Πράγματι, υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν την ύπαρξη μηχανισμού επιδιόρθωσης των πρωτεϊνών που υφίστανται νίτρωση, χωρίς, μάλιστα, να υπάρχει εμφανής αποδόμηση των πρωτεϊνών<sup>85-87</sup>.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η νίτρωση των πρωτεϊνών αποτελεί μια εκλεκτική βιολογική διεργασία που πηγάζει από το μονοξειδίου του αζώτου με δυνητικά σημαντικές βιολογικές λειτουργίες.

### **2.9 Καρβονυλίωση πρωτεϊνών**

Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων (RCO) αποτελεί μια από τις πιο ευαίσθητες μεθόδους εκτίμησης του οξειδωτικού στρες τα τελευταία χρόνια. Τα καρβονύλια (αλδεϋδες και κετόνες) μπορούν να σχηματιστούν κάτω από την επίδραση διαφόρων οξειδωτικών



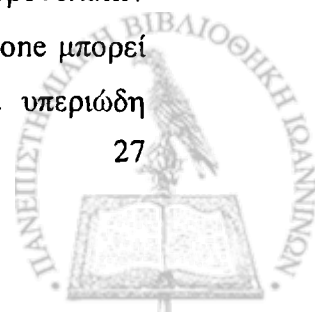
παραγόντων σε πρωτεΐνες, λίπη και υδατάνθρακες. Συγκεκριμένα στις πρωτεΐνες το φαινόμενο αφορά κυρίως τα αμινοξέα προλίνη, αργινίνη, λυσίνη και θρεονίνη<sup>88</sup>.

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών ανήκει σε εκείνες τις οξειδωτικές τροποποιήσεις που, όπως ήδη έχει αναφερθεί, είναι μη αναστρέψιμες<sup>44</sup>. Πέρα από την άμεση οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών, και κυρίως των αμινοξέων που αναφέρθηκαν, καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες μπορούν να σχηματιστούν και διαμέσου άλλων πολύπλοκων μηχανισμών. Έτσι, προϊόντα αυτοοξειδωσης των υδατανθράκων και των λιπιδίων (αλδεΐδες), όταν επιδρούν σε πρωτεΐνες οδηγούν στο σχηματισμό των τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGEs, advanced glycation and end products)<sup>89</sup> και των τελικών προϊόντων προηγμένης λιπιδιακής υπεροξειδωσης (ALEs advanced lipoxidation end products)<sup>90</sup>. Για παράδειγμα, οι υδατάνθρακες μπορούν να σχηματίσουν καρβονύλια, όπως glyoxal, methylglyoxal, arabinose, glycoaldehyde και το 3-deoxyglucosone. Αυτά τα RCOs μπορούν να αντιδράσουν με μη ενζυμικό μηχανισμό με πρωτεϊνικές αμινομάδες και να σχηματίσουν, μέσα από μια σειρά από οξειδωτικές και μη οξειδωτικές αντιδράσεις, μη μετατρέψιμα AGEs, όπως για παράδειγμα η carboxymethyllysine (CML), η pentosidine, η pyrraline, η imidazolone, η glyoxal-lysine dimmer (GOLD) και η methylglyoxal-lysine dimmer (MOLD). Η λιπιδιακή υπεροξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως το αραχιδονικό οξύ, επίσης οδηγεί στο σχηματισμό RCOs, όπως glyoxal, malondialdehyde, hydroxynonenal and acrolein. Αυτά τα υψηλής δραστηριότητας RCOs μπορούν επίσης να συνδυαστούν με πρωτεΐνες και να σχηματίσουν τα ALEs όπως η malondialdehyde-lysine και η hydroxynonenal<sup>45,91-93</sup>. Τέλος RCOs (glyoxal, methylglyoxal, acrolein and glycoaldehyde) μπορούν επίσης να σχηματιστούν κατά τη διάρκεια του καταλυόμενου από την μυελοπεροξειδάση, μεταβολισμού των αμινοξέων L-σερίνη και L-θρεονίνη<sup>94</sup>.

Ο όρος καρβονυλικό στρες (carbonyl stress) έχει καθιερωθεί για να περιγράψει όλη αυτή την πολυπλοκότητα των αντιδράσεων που οδηγεί στη συσσώρευση των RCOs και στην οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών<sup>95,96</sup>.

### **Μέθοδοι ανίχνευσης**

Πολλές μέθοδοι είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση των καρβονυλίων. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες και πιθανά οι πιο αξιόπιστες μέθοδοι περιλαμβάνουν την ανίχνευση του σταθερού προϊόντος 2,4 dinitrophenyl (DNP) hydrozone μετά την επώαση των καρβονυλικών ομάδων με 2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH). Το σταθερό προϊόν DNP hydrozone μπορεί να ανιχνευτεί με διάφορα μέσα. Από μόνο του το προϊόν αυτό απορροφά υπεριώδη

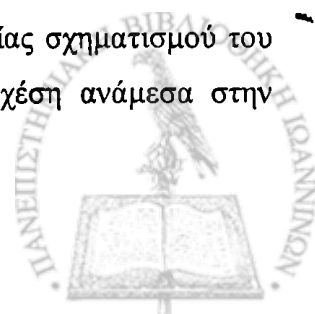


ακτινοβολία έτσι ώστε το ολικό καρβονυλικό περιεχόμενο μιας πρωτεΐνης ή μείγματος πρωτεϊνών να μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομετρική μέθοδο στα 370 nm. Η μέθοδος απαιτεί σχετικά καθαρό δείγμα, χωρίς την παρουσία χρωστικών (πχ αιμοσφαιρίνης) ή νουκλειικών οξέων που επίσης απορροφούν στα 370nm<sup>97;98</sup>. Ιδιαίτερης σημασίας βέβαια είναι η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών στους βιολογικούς ιστούς και τα υγρά του οργανισμού που υφίστανται τη βλάβη. Έτσι τα τελευταία χρόνια η ανίχνευση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών έχει διευκολυνθεί με τη χρήση ανοσοχημικών μεθόδων (ELISA και Western blotting analysis), καθώς είναι διαθέσιμα ειδικά αντισώματα έναντι των DNP προϊόντων<sup>99-101</sup>. Αυτές οι δύο μέθοδοι έχουν σημαντικά μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα σε σύγκριση με όλες τις άλλες μεθόδους προσδιορισμού ολικών καρβονυλίων. Ιδιαίτερα με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης δίνεται και η δυνατότητα ταυτοποίησης συγκεκριμένων πρωτεϊνών που υφίστανται καρβονυλίωση, κυρίως όταν η μέθοδος συνδυαστεί με μικροαλληλούχιση ή φασματοσκοπία μάζας (microsequencing ή mass spectrometry). Πολλά, υψηλής ποιότητας, τόσο πολυκλωνικά αλλά και μονοκλωνικά, anti-DNP αντισώματα είναι διαθέσιμα στο εμπόριο (Sigma, Intergen, Oncor).

#### *Παρουσία καρβονυλίων σε παθολογικές καταστάσεις και βιολογική σημασία του φαινομένου της καρβονυλίωσης*

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των πρωτεϊνών σε καρβονύλια αποτελεί τον πιο κοινό δείκτη της πρωτεϊνικής οξειδωσης, ενώ η συσσώρευση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών έχει παρατηρηθεί σε μια σειρά ανθρωπίνων νοσημάτων, όπως η νόσος Alzheimer<sup>102-104</sup>, η νόσος του Parkinson<sup>105</sup>, η ουραιμία<sup>106;107</sup>, η βρογχοπνευμονική δυσπλασία<sup>108</sup>, το σύνδρομο της αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων<sup>109</sup>, οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου<sup>110</sup>, καθώς και η ρευματοειδής αρθρίτιδα<sup>111</sup>.

Η ανίχνευση αυξημένων επιπέδων πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης αποτελεί δείκτη όχι μόνο αυξημένου οξειδωτικού στρες αλλά και πρωτεϊνικής δυσλειτουργίας. Έτσι, για παράδειγμα, αύξηση της καρβονυλίωσης της ακτίνης εντοπίστηκε στους νευρώνες περιοχών του εγκεφάλου που προσβάλλονται από τη νόσο του Alzheimer<sup>103</sup>. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι οξειδωτικές τροποποιήσεις της απομονωμένης πολυπεπτιδικής αλυσίδας της ακτίνης οδηγεί σε λειτουργικές διαταραχές της πρωτεΐνης, όπως είναι η αλληλεπίδραση με άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, με τελικό αποτέλεσμα τη διαταραχή στη λειτουργία της σύσπασης<sup>112;113</sup>. Επίσης, σημαντική είναι η διαταραχή της διεργασίας σχηματισμού του θρόμβου από την οξειδωτική τροποποίηση του ινωδογόνου<sup>114</sup>. Η σχέση ανάμεσα στην



πρωτεϊνική οξειδωση, την πρωτεϊνική δυσλειτουργία και τα διάφορα νοσήματα παραμένει κατά ένα μεγάλο μέρος ασαφής. Παρόλα αυτά είναι γνωστό ότι οξειδωτικές τροποποιήσεις ενζύμων και δομικών πρωτεϊνών μπορούν να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία πολλών νοσημάτων. Για παράδειγμα η συνθετάση της γλουταθειόνης, η δραστηριότητα της οποίας είναι ελαττωμένη στη νόσο Alzheimer<sup>115;116</sup>, έχει ταυτοποιηθεί ως ένα ειδικά οξειδωμένο ένζυμο στη νόσο<sup>104</sup>. Επίσης, οξειδωτικά τροποποιημένες χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) έχουν βρεθεί σε αθηροσκληρωτικούς ιστούς και ενισχύουν την άποψη ότι η οξειδωση της LDL έχει ένα σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία της αθηροσκλήρωσης<sup>117;118</sup>.

Συμπερασματικά φαίνεται πως το φαινόμενο της καρβονυλίωσης παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, ενώ ο προσδιορισμός των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών αποτελεί ένα πολύ ευαίσθητο και ειδικό δείκτη αυξημένου οξειδωτικού στρες.

## 2.10 Αμυντικοί μηχανισμοί

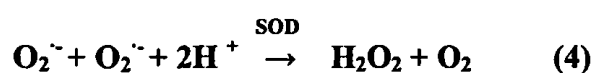
Από όσα αναφέρθηκαν είναι εμφανές ότι η δημιουργία ROS/RNS στα κύτταρα των αερόβιων οργανισμών είναι συνεχής και λαμβάνει χώρα ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Η συσσώρευση όμως αυτών των ενώσεων θα είχε καταστροφικές, για το κύτταρο, συνέπειες. Για να καταφέρουν οι αερόβιοι οργανισμοί να επιζήσουν έχουν αναπτύξει ένα σύστημα αμυντικών μηχανισμών που εξισορροπούν την παραγωγή των δραστικών οξειδωτικών ουσιών, απομακρύνοντας αυτές τις ουσίες μόλις δημιουργηθούν. Όταν βέβαια η παρουσία αυτών των δραστικών ενώσεων υπερκαλύψει την άμυνα του οργανισμού, τότε τα αποτελέσματα για το κύτταρο μπορεί να αποβούν καταστρεπτικά.

Οι ουσίες που απαρτίζουν αυτό το αμυντικό σύστημα του οργανισμού καλούνται αντιοξειδωτικές ουσίες. Αντιοξειδωτικό, με τη χημική θεώρηση του όρου, είναι κάθε μόριο που μπορεί να δράσει ως δότης ηλεκτρονίων σε ένα οξειδωτικό παράγοντα και με αυτό τον τρόπο να προφυλάξει άλλα μόρια που θα ήταν στόχοι αυτού του παράγοντα<sup>119</sup>. Ένας άλλος πιο γενικός ορισμός, ο οποίος όμως θα ταίριαζε περισσότερο σε μια βιολογική θεώρηση του όρου είναι ο ακόλουθος: αντιοξειδωτική είναι κάθε ουσία η παρουσία της οποίας είναι ικανή να προστατέψει ένα βιολογικό σύστημα, όπως ένα κύτταρο ή οργανισμό, από βλάβες οι οποίες προκαλούνται από την έκθεσή του σε συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού στρες.

Στην πρώτη γραμμή άμυνας για την απομάκρυνση των ROS είναι κυρίως τα ένζυμα δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (SODs), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP) και οι περοξυρεδοξίνες (PRx) (σχήμα 1).



Η SOD καταλύει την αναγωγή του  $O_2^{\cdot -}$  προς  $H_2O_2$  σύμφωνα με την αντίδραση 4<sup>16,17</sup>. Αν και η αντίδραση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί και μη ενζυμικά με υψηλή ταχύτητα, η παρουσία του ενζύμου αυξάνει την ταχύτητα της αντίδρασης περισσότερο από 10000 φορές. Η δισμουτάση του σουπεροξειδίου έχει ανιχνευθεί σχεδόν σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, τόσο στο κυτταροδιάλυμα, σε μια μορφή που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο (CuZn-SOD), όσο και στα μιτοχόνδρια, με μια μορφή που περιέχει μαγγάνιο (Mn-SOD). Η υψηλή ταχύτητα της αντίδρασης, σε συνδυασμό με την παρουσία της σε όλα τα κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα η συγκέντρωση του  $O_2^{\cdot -}$  να είναι ιδιαίτερα χαμηλή. Έχει υπολογιστεί ότι παρουσία της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου, η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ισορροπίας (steady state) του  $O_2^{\cdot -}$  είναι περίπου ίση με  $10^{-11}$  M.



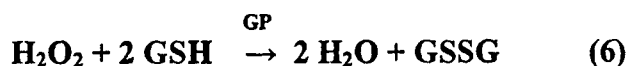
Το  $H_2O_2$  που σχηματίζεται κυρίως από την παραπάνω αντίδραση, μπορεί να απομακρυνθεί στη συνέχεια με τη δράση ορισμένων άλλων ενζύμων. Ένα από αυτά, η καταλάση (CAT), καταλύει την αναγωγή του  $H_2O_2$  με δύο ηλεκτρόνια προς  $H_2O$ , σύμφωνα με την αντίδραση 5.



Η καταλάση έχει βρεθεί σχεδόν σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, κυρίως σε κυτταρικά οργανίδια που καλούνται υπεροξεισωμάτια<sup>120</sup>. Η έλλειψη της καταλάσης ή η περιορισμένη δραστηριότητά της δεν φαίνεται να έχει σοβαρά αποτελέσματα στους οργανισμούς, πιθανά εξαιτίας της ύπαρξης και άλλων ενζυμικών συστημάτων για την απομάκρυνση του  $H_2O_2$ . Τέτοια ένζυμα είναι για παράδειγμα η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP), μια σεληνιοεξαρτώμενη πρωτεΐνη που εντοπίζεται κυρίως στο κυτταροδιάλυμα και τα μιτοχόνδρια. Το ένζυμο αυτό ανάγει το  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  οξειδώνοντας την γλουταθειόνη (GSH) σε GSSG (οξειδωμένη γλουταθειόνη) (αντίδραση 6). Το ένζυμο εμφανίζει απόλυτη εξειδίκευση όσον αφορά τη γλουταθειόνη, αλλά μπορεί να ανάγει και

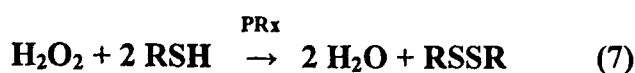


διαφορετικά υπεροξειδία, όπως είναι τα λιπιδιακά υπεροξειδία, τα οργανικά υπεροξειδία, τα υπεροξειδία της χοληστερόλης, ακόμη και το περοξυνιτρώδες.



Και τα δύο παραπάνω ένζυμα, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, απαντώνται σε όλους σχεδόν τους ιστούς και πιστεύεται ότι συνεργάζονται με σκοπό την απομάκρυνση του  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Η καταλάση απαντάται κυρίως στα υπεροξεισωμάτια, ενώ η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια<sup>121</sup>. Έτσι τα ένζυμα αυτά θεωρούνται υπεύθυνα για την αποικοδόμηση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  στα αντίστοιχα σημεία του κυττάρου. Σε ορισμένα κύτταρα όμως απαντώνται και τα δύο ένζυμα στο κυτταρόπλασμα. Στις περιπτώσεις αυτές πιστεύεται ότι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  όταν αυτό βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ όταν βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις απομακρύνεται κυρίως από την καταλάση<sup>122</sup>. Ασθενείς με γενετικές ανωμαλίες στο γονίδιο της καταλάσης δεν εμφανίζουν σοβαρές κλινικές επιπτώσεις, παρά μόνο κάτω από συνθήκες παραγωγής υψηλών συγκεντρώσεων  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Αντίθετα γενετικές διαταραχές που αφορούν την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι πολύ σπάνιες, αλλά έχουν πολύ σοβαρές επιπτώσεις.

Λιγότερο γνωστά, αλλά εξίσου σημαντικά, είναι τα ένζυμα περοξυρεδοξίνες (PRx). Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την αναγωγή του  $\text{H}_2\text{O}_2$  από τη γλουταθειόνη, αλλά και από μια σειρά άλλων θειολών, με μια αντίδραση παρόμοια με αυτή της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (αντίδραση 7)<sup>123-125</sup>.



Εκτός από τα παραπάνω ένζυμα, το κύτταρο επιστρατεύει και άλλους αμυντικούς μηχανισμούς για την προστασία του από τις ελεύθερες ρίζες και τις ROS. Κεντρικό ρόλο σε αυτούς τους μηχανισμούς φαίνεται να παίζουν μικρομοριακές προστατευτικές ουσίες, όπως οι βιταμίνες C και E, η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, η ουμπικινόνη, τα φλαβονοειδή, τα καροτενοειδή, κα. Οι ενώσεις αυτές, που καλούνται συνήθως «εκκαθαριστές ελευθέρων



ριζών» (free radical scavengers), έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και να αναστέλλουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις τις οποίες προκαλούν.

Σημαντική συμβολή για την αντιμετώπιση των ελευθέρων ριζών έχουν και οι δεσμευτές μετάλλων, όπως η τρανσφερίνη, η λακτοφερίνη, η φερριτίνη, η αιμοσιδηρίνη, η σερουλοπλασμίνη κτλ. Αυτές οι ενώσεις δεσμεύουν ελεύθερα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης, κυρίως Fe και Cu, καθώς και ελεύθερης αίμης, με αποτέλεσμα να αναστέλλουν τη συμβολή τους σε αντιδράσεις δημιουργίας ελευθέρων ριζών. Για παράδειγμα ελεύθερα ιόντα  $Fe^{+2}$  και  $Cu^{+}$ , αντιδρούν με το  $H_2O_2$ , αλλά και άλλα οργανικά υπεροξείδια και σχηματίζουν τις πολύ δραστικές ρίζες  $HO\cdot$  και  $RCO\cdot$ . Κατά συνέπεια οι μεταλλοδεσμευτικές ενώσεις αναστέλλουν τις αντιδράσεις δημιουργίας των ριζών αυτών.

Πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν και οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί που έχουν την ικανότητα να διορθώνουν οξειδωτικές τροποποιήσεις στο DNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν συνήθως την αναγνώριση της βλάβης, την απομάκρυνση του τροποποιημένου τμήματος ή μορίου και τέλος την επιδιόρθωσή του.



## Γ. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ

### 3.1 Εισαγωγή

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας στους ασθενείς με ΧΝΝ και ιδιαίτερα στους ασθενείς τελικού σταδίου ή αυτούς που υποβάλλονται σε ΑΚΘ<sup>126-128</sup>. Έτσι, η θνητότητα σε αυτούς από καρδιαγγειακά επεισόδια υπολογίζεται να είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό<sup>126</sup>. Η ύπαρξη των κλασικών παραγόντων κινδύνου, όπως η υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία και ο σακχαρώδης διαβήτης, εν μέρει μόνο μπορούν να εξηγήσουν την έκταση και τη σοβαρότητα αυτού του προβλήματος<sup>129-131</sup>. Έτσι τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερο δίνεται έμφαση στην ύπαρξη «μη κλασικών» παραγόντων κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, όπως η φλεγμονή, η κακή διατροφή (υποαλβουμιναιμία), η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και η υπερομοκυστεϊναιμία, φαινόμενα που, τουλάχιστον εν μέρει, σχετίζονται με το αυξημένο οξειδωτικό στρες<sup>132</sup>.

Πέρα όμως από τη συμμετοχή στην εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου, το οξειδωτικό στρες φαίνεται ότι διαδραματίζει βασικό ρόλο και στην εξέλιξη της ίδιας της νεφρικής νόσου<sup>133;134</sup>. Έτσι οξειδωτικοί παράγοντες φαίνεται ότι εμπλέκονται σε διαταραχές της νεφρικής αιματικής ροής, της σπειραματικής διήθησης, αλλά και σε διαταραχές που αφορούν την ενεργοποίηση μεσολαβητών που ευοδώνουν τη φλεγμονή και μορίων προσκόλλησης. Η απορύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα NFκΒ, αλλά και η ενεργοποίηση της κυτοκίνης TGFβ<sub>1</sub>, που κυρίως ενοχοποιούνται στην εξέλιξη της νεφρικής νόσου, σχετίζονται επίσης με αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες.

Η θεωρία που συνδέει την εξέλιξη της νόσου με τα αυξημένα επίπεδα ROS αλλά και RNS, κερδίζει συνεχώς έδαφος τα τελευταία χρόνια. Η τάση αυτή στηρίζεται σε ερευνητικές παρατηρήσεις οι οποίες αποδεικνύουν ότι: α) αυξημένα επίπεδα οξειδωτικών παραγόντων έχουν ανιχνευτεί σε αυτούς τους ασθενείς, β) διάφορες στρατηγικές αντιοξειδωτικής αντιμετώπισης έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα, τουλάχιστον σε πειραματικά μοντέλα και γ) έκθεση υγιών νεφρών (νεφρικά μοντέλα) σε οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες, οι οποίες είναι πανομοιότυπες με αυτές που παρατηρούνται στις βιοψίες νεφρών ασθενών με ΧΝΝ.



Φαίνεται, λοιπόν, ότι το οξειδωτικό στρες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τη εξέλιξη της νεφρικής νόσου, αλλά και ότι η ίδια η νεφρική νόσος επιδεινώνει τα ήδη αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες, δημιουργώντας έτσι ένα φαύλο κύκλο (σχήμα 6).



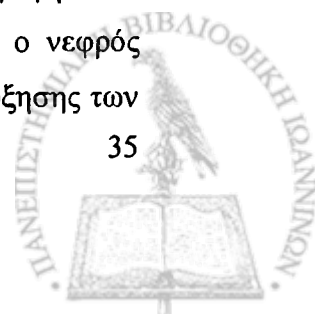
Σχήμα 6. ΧΝΝ και οξειδωτικό στρες. Ένας φαύλος κύκλος

### 3.2 Ο ρόλος της XNN στην εμφάνιση του οξειδωτικού στρες

Συνθήκες οξειδωτικού στρες είναι δυνατόν να δημιουργούνται με αρκετούς διαφορετικούς μηχανισμούς κατά την εξέλιξη της XNN. Στους μηχανισμούς αυτούς εμπλέκονται τόσο ενδογενή νεφρικά κύτταρα όσο και φλεγμονώδη κύτταρα, τα οποία προσελκύονται στο νεφρό διαμέσου της έκλυσης διαφόρων χημειοτακτικών παραγόντων. Σημαντική, επίσης, συνεισφορά στην ανάπτυξη συνθηκών οξειδωτικού στρες και κατά συνέπεια στην εξέλιξη της νόσου, φαίνεται ότι έχει και η λευκωματουρία, η οποία σταδιακά εξελίσσεται καθώς η νόσος επιδεινώνεται.

Τα λευκοκύτταρα που για διάφορους λόγους (τόσο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις) διηθούν το νεφρό, αποτελούν τη βασική πηγή δημιουργίας ROS/RNS. Τα λευκοκύτταρα καταναλώνουν υψηλά επίπεδα οξυγόνου, έτσι ώστε οι ενδιάμεσες μορφές οξυγόνου που δημιουργούνται κατά την αναγωγή του στην αναπνευστική αλυσίδα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην άμυνα του οργανισμού ενάντια σε διάφορους παθογόνους οργανισμούς. Έτσι, η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου ( $O_2$ ) με ένα ηλεκτρόνιο σε ανιόν του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) με τη βοήθεια του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου «NADPH οξειδάση» των λευκοκυττάρων, φαίνεται ότι αποτελεί μια βασική πηγή δημιουργίας του οξειδωτικού στρες στο νεφρό. Τα λευκοκύτταρα διαθέτουν επίσης και άλλα ένζυμα, όπως είναι η δισμουτάση του σουπεροξειδίου, η συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου και η μυελοπεροξειδάση, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), του μονοξειδίου του αζώτου ( $NO^{\cdot}$ ), του περοξεινιτρώδους ( $ONOO^{\cdot}$ ) και του υποχλωριώδους οξέος ( $HOCl$ ), αντίστοιχα, που με τη σειρά τους συμβάλλουν στη δημιουργία οξειδωτικών βλαβών.

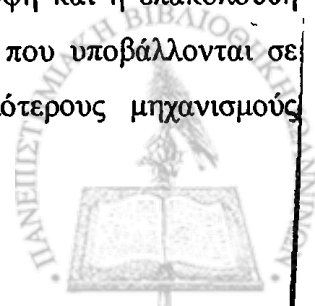
Εκτός όμως από τα κύτταρα που μπορεί να διηθούν το νεφρό, φαίνεται ότι και τα ενδογενή νεφρικά κύτταρα μπορούν να συμβάλλουν στη δημιουργία οξειδωτικών παραγόντων. Από τις αρχές της δεκαετίας του 50 υπήρχαν ενδείξεις ότι στο φυσιολογικό νεφρικό ιστό υπάρχουν τα υψηλότερα επίπεδα  $H_2O_2$  συγκριτικά με όλους τους άλλους ιστούς<sup>135</sup>, παρατηρήσεις οι οποίες επιβεβαιώθηκαν και από άλλες μεταγενέστερες μελέτες<sup>136</sup>. Το γεγονός αυτό αντανακλά τις αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις των νεφρικών κυττάρων για όλες αυτές τις πολύπλοκες διεργασίες διήθησης και μεταφοράς που επιτελούνται στα σπειράματα και στα σωληνάρια, με αποτέλεσμα την κατανάλωση υψηλών επιπέδων οξυγόνου, την παραγωγή ικανών ποσοτήτων ATP αλλά και την αυξημένη παραγωγή ROS που δεν ανάγονται πλήρως στην αναπνευστική αλυσίδα, όπως το  $H_2O_2$ . Όταν ο νεφρός πάσχει, τότε ενισχύονται προϋπάρχοντες ή υπεισέρχονται και άλλοι μηχανισμοί αύξησης των



οξειδωτικών παραγόντων. Έτσι στην εξέλιξη της νεφρικής νόσου και καθώς όλο και περισσότεροι νεφρώνες χάνονται, οι εναπομείναντες νεφρώνες υπόκεινται σε τέτοια μεταβολική προσαρμογή ώστε να καταναλώνουν περισσότερο οξυγόνο για τη διατήρηση του ενεργειακού επιπέδου με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή οξειδωτικών παραγόντων<sup>137</sup>. Σημαντικό ρόλο, επίσης, διαδραματίζει η λευκωματουρία που μπορεί να συνοδεύει διάφορες νεφρικές παθήσεις. Έτσι η επίδραση στα νεφρικά σωληνάρια πρωτεϊνών που συνδέουν σίδηρο, όπως η τρανσφερίνη και οι οποίες διηθούνται λόγω της διαταραχής της σπειραματικής διήθησης, μπορεί να έχει σημαντικά αποτελέσματα<sup>138</sup>. Η σύνδεση του σιδήρου με την τρανσφερίνη εξαρτάται από το pH. Όταν το σύμπλεγμα σιδήρου-τρανσφερίνης βρεθεί στα νεφρικά σωληνάρια, τότε καθώς το pH των ούρων είναι όξινο, ο σίδηρος μπορεί να αποδεσμευτεί από την τρανσφερίνη και να παίζει καταλυτικό ρόλο σε διάφορες οξειδωτικές τροποποιήσεις στον εξωκυττάριο χώρο. Επιπλέον, αν το σύμπλεγμα σιδήρου-τρανσφερίνης ενδοκυττωθεί, το χαμηλό pH των λυσοσωματίων εκ νέου θα παίζει ευνοϊκό ρόλο στην αποδέσμευση του σιδήρου και στην πρόκληση διάφορων τοξικών βλαβών, μέσω οξειδωτικών τροποποιήσεων, ενδοκυττάρια.

Εκτός όμως από την τοπική παραγωγή οξειδωτικών παραγόντων στο νεφρό, η έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας οδηγεί και σε συστηματικές εκδηλώσεις αυξημένου οξειδωτικού στρες. Έτσι, διάφοροι παράγοντες που ευοδώνουν το οξειδωτικό στρες (ουραιμικές τοξίνες) και των οποίων ο μεταβολισμός ή η απέκκρισή τους εξαρτάται από το νεφρό, μπορεί να συσσωρεύονται στο πλάσμα, λόγω της νεφρικής δυσλειτουργίας, και να κινητοποιούν καταρράκτες οξειδωτικών αντιδράσεων<sup>96,139</sup>. Η ουρία, το οξαλικό οξύ, η κυστεΐνη, η ομοκυστεΐνη, παράγοντες του συμπληρώματος και η β<sub>2</sub> μικροσφαιρίνη, είναι ορισμένοι από αυτούς. Ιδιαίτερα πρέπει να τονιστεί ο σημαντικός ρόλος των αυξημένων επιπέδων ομοκυστεΐνης που παρατηρούνται σε ασθενείς με ΧΝΝ. Αυτό το πλούσιο σε θειολικές ομάδες αμινοξύ μπορεί να υποστεί αντιδράσεις αυτοοξειδωσης με αποτέλεσμα τη δημιουργία οξειδωτικών παραγόντων<sup>140</sup>.

Άλλος μηχανισμός που συμβάλλει στα αυξημένα επίπεδα του συστηματικού οξειδωτικού στρες αφορά το ένζυμο της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης του πλάσματος. Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το νεφρό με αποτέλεσμα, σε καταστάσεις νεφρικής νόσου, να μειώνεται σημαντικά η παραγωγή του, οπότε και η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος<sup>141,142</sup>. Επιπρόσθετα, η περιορισμένη σε λεύκωμα διατροφή και η επακόλουθη υποαλβουμιναιμία των ασθενών αυτών και ιδιαίτερα των ασθενών που υποβάλλονται σε ΑΚΘ, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ενός από τους κυριότερους μηχανισμούς



αντιοξειδωτικής προστασίας του οργανισμού<sup>143</sup>. Οι υψηλές συγκεντρώσεις της αλβουμίνης στον οργανισμό, η ύπαρξη μιας σουλφυδρυλικής ομάδας στο μόριό της (-SH), καθώς και η ικανότητά της να δεσμεύει ιόντα σιδήρου και χαλκού με τέτοιο τρόπο ώστε να μην μπορούν να καταλύσουν αντιδράσεις τύπου Fenton, την καθιστούν ως ένα από τα κυριότερα αντιοξειδωτικά του οργανισμού<sup>144</sup>.

### 3.2.1 Μέθοδοι υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας και οξειδωτικό στρες

Ένα ιδιαίτερο όμως κεφάλαιο αποτελεί η επίδραση των μεθόδων υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας και κυρίως της ΑΚΘ, στο οξειδωτικό στρες της ΧΝΝ. Στους αρρώστους αυτούς σημαντικό ρόλο έχει τόσο η αύξηση των οξειδωτικών παραγόντων, όσο και η σημαντική ελάττωση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Εκτός, λοιπόν, από τους παράγοντες που προαναφέρθηκαν και που έχουν σχέση με την ουραιμία, οι ασθενείς που υποβάλλονται σε ΑΚΘ έχουν κάποιους επιπλέον λόγους αυξημένου οξειδωτικού στρες.

Ένας από τους κυριότερους λόγους σχετίζεται με την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων<sup>145-148</sup>. Είναι αυτονόητο ότι σε όλη τη διεργασία της ΑΚΘ, η επαφή του αίματος με ξένα σώματα (συνδέσεις, μεμβράνες), ενεργοποιεί βασικά κυτταρικά συστατικά του αίματος, όπως τα μακροφάγα. Στη διεργασία αυτή σημαντικό ρόλο φαίνεται ότι παίζει και η παρουσία ενδοτοξινών στα διαλύματα αιμοκάθαρσης. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, όπως ήδη έχει αναφερθεί, έχουν την ικανότητα, μέσω διαφόρων μηχανισμών, να παράγουν μια σειρά από ROS/RNS. Έτσι, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει επικεντρωθεί στη μελέτη όλου και περισσότερο βιοσυμβατών μεμβρανών αιμοκάθαρσης, σε μια προσπάθεια μείωσης της ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων.

Σημαντική είναι όμως και η μείωση των αντιοξειδωτικών παραγόντων στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς και κυρίως της βιταμίνης C (ασκορβικό οξύ). Το ασκορβικό οξύ, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά του οργανισμού μας. Τα φυσιολογικά επίπεδα του ασκορβικού οξέος στο πλάσμα κυμαίνονται από 25-50μΜ. Η πλειονότητα των ασθενών που υποβάλλονται σε χρόνια ΑΚΘ έχουν επίπεδα ασκορβικού οξέος πολύ πιο χαμηλά από τα φυσιολογικά.<sup>148-151</sup> Αυτό το γεγονός οφείλεται κυρίως στις σημαντικές απώλειες της βιταμίνης C κατά τη διάρκεια της ΑΚΘ, καθώς πρόκειται για μια μικρού μοριακού βάρους, υδατοδιαλυτή ένωση, που εύκολα διέρχεται διαμέσου των μεμβρανών και χάνεται στο διάλυμα της ΑΚΘ. Παράγοντες που, επίσης, συμβάλλουν στα μειωμένα επίπεδα του ασκορβικού οξέος στο πλάσμα των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών είναι η αυξημένη κατανάλωσή του από τους διάφορους



οξειδωτικούς παράγοντες, καθώς και η φτωχή διατροφή σε φρούτα και λαχανικά (για τον κίνδυνο της υπερκαλιαιμίας). Σύμφωνα μάλιστα με προηγούμενες μελέτες, η μείωση κατά τη διάρκεια μιας συνεδρίας ΑΚΘ, των ήδη ελαττωμένων στο πλάσμα επιπέδων ασκορβικού οξέος, φτάνει το 30-50%<sup>152</sup>. Έτσι μετά την ΑΚΘ τα επίπεδά του, σε ορισμένους ασθενείς, αγγίζουν τα 5μΜ<sup>153</sup>, φτάνοντας τα όρια του σκορβούτου.

Όσον αφορά την ΠΚ, φαίνεται ότι η διαδικασία είναι περισσότερο 'βιοσυμβατή', αφού η περιτοναϊκή μεμβράνη είναι αυτή που παίζει το βασικό ρόλο ανταλλαγής ουσιών στους ουραιμικούς ασθενείς. Υπάρχουν όμως κάποιοι συγκεκριμένοι παράγοντες που προάγουν το οξειδωτικό στρες και στους ασθενείς αυτούς<sup>154</sup>. Ο πιο σημαντικός παράγοντας είναι τα διαλύματα γλυκόζης που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια αυτής της κάθαρσης. Η γλυκόζη είναι μια αρκετά ενεργή ουσία που μπορεί να υποστεί διάφορες τροποποιήσεις, όπως είναι η αποδόμησή της κάτω από τις συνθήκες αποστείρωσης και αποθήκευσης των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται<sup>155</sup>. Τα προϊόντα αυτά αποδόμησης συμμετέχουν σε μια σειρά αντιδράσεων μέσα στην περιτοναϊκή κοιλότητα, με αποτέλεσμα την παραγωγή AGEs προϊόντων, τα οποία, όπως ήδη έχει αναφερθεί, αποτελούν δείκτες πολύπλοκων διεργασιών οξειδωτικής τροποποίησης των πρωτεϊνών<sup>156</sup>. Ένα από τα βασικά πεδία έρευνας εστιάζεται στο αν τα υψηλά αυτά επίπεδα AGE περνούν ή όχι στη συστηματική κυκλοφορία<sup>154;157</sup>. Επίσης, η περιορισμένη διατροφή και σε αυτούς τους ασθενείς σε φρούτα και λαχανικά (για τον κίνδυνο της υπερκαλιαιμίας), αλλά και οι αυξημένες απώλειες διαμέσου της περιτοναϊκής μεμβράνης στο διάλυμα, έχει ως αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδα στον οργανισμό σημαντικών αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως η βιταμίνη C<sup>158-160</sup>. Τέλος, οι σημαντικές απώλειες αλβουμίνης διαμέσου της περιτοναϊκής μεμβράνης, σε συνδυασμό με την κακή θρέψη, συμβάλλουν επίσης στην σημαντική μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας αυτών των ασθενών<sup>161</sup>.

Πρέπει όμως να αναφερθεί ότι όλα τα άτομα που υποβάλλονται σε κάποια από τις μεθόδους υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, καθώς και οι περισσότεροι ασθενείς προτελικού και τελικού σταδίου, λαμβάνουν σκευάσματα σιδήρου, κυρίως παρεντερικά, καθώς και ερυθροποιητίνη με σκοπό τη διόρθωση της αναιμίας. Η διόρθωση της αναιμίας έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς η αναιμία ενοχοποιείται για τα αυξημένα επίπεδα του οξειδωτικού στρες των ασθενών με ΧΝΝ, κυρίως λόγω της υποξίας και της ενεργοποίησης διαφόρων μηχανισμών, όπως του συστήματος των κατεχολαμινών και των λευκοκυττάρων. Σίδηρος και ερυθροποιητίνη, όμως, μπορεί να έχουν σημαντικές επιδράσεις στο οξειδωτικό στρες της ουραιμίας.



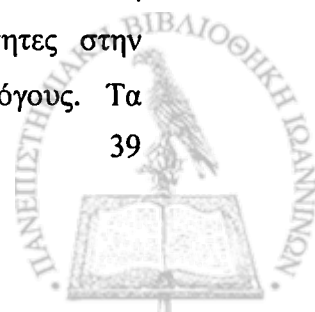
### 3.2.2 Σίδηρος και οξειδωτικό στρες

Οι ασθενείς με ΧΝΝ και κυρίως οι τελικού σταδίου, καθώς και οι αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς, εμφανίζουν σημαντική ανεπάρκεια σιδήρου, τόσο απόλυτη, όσο και λειτουργική. Βασικά αίτια αυτής της ανεπάρκειας είναι η μειωμένη πρόσληψη με την τροφή, η απώλεια αίματος κατά τη διάρκεια της εξωνεφρικής κάθαρσης ή λόγω αιμορραγιών από το γαστρεντερικό σωλήνα, η ανεπαρκής απορρόφηση του σιδήρου (η οποία επηρεάζεται σημαντικά και από τα χαμηλά επίπεδα του ασκορβικού οξέος), αλλά και η αναστολή της απελευθέρωσής του από τα μακροφάγα, οι πολύ συχνές αιμοληψίες για διαγνωστικές εξετάσεις, αλλά και οι αυξημένες απαιτήσεις σε σίδηρο των ασθενών που λαμβάνουν παράγοντες ενεργοποίησης της ερυθροποίησης (ερυθροποιητίνη). Έτσι η χορήγηση του σιδήρου σε αυτούς τους ασθενείς θεωρείται επιτακτική<sup>162</sup>. Η από του στόματος χορήγηση σιδήρου κατά βάση είναι ανεπιτυχής, κυρίως λόγω ανεπαρκούς απορρόφησης και για αυτό το λόγο ο σίδηρος χορηγείται κυρίως παρεντερικά (συνδεδεμένος με διάφορα πολυμερή όπως δεξτράνη, σουκρόζη ή ως γλυκονικός σίδηρος). Ο σίδηρος στο πλάσμα κυκλοφορεί συνδεδεμένος με την τρανσφερίνη, της οποίας όμως οι θέσεις δέσμησης είναι περιορισμένες, Έτσι σε περίπτωση υπερφόρτωσης του οργανισμού με σίδηρο αυξάνεται σημαντικά το ποσοστό ελεύθερου σιδήρου, το οποίο και μπορεί να προκαλέσει διάφορες τοξικές βλάβες, κυρίως λόγω της ικανότητας του να συμμετέχει σε αντιδράσεις σχηματισμού ελευθέρων ριζών (OH·) (αντιδράσεις τύπου Fenton, αντίδραση 2), όπως έχει ήδη αναφερθεί. Έτσι διάφορες μελέτες σε ουραιμικούς ασθενείς και κυρίως αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, έδειξαν μια σημαντική αύξηση διάφορων οξειδωτικών παραγόντων μετά από την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου<sup>163-169</sup>. Χρειάζεται επομένως ιδιαίτερη προσοχή κατά την παρεντερική χορήγηση σιδήρου στους ασθενείς αυτούς.

### 3.2.3 Ερυθροποιητίνη και οξειδωτικό στρες

Η ερυθροποιητίνη είναι μια ορμόνη που παράγεται από τους νεφρούς και προάγει την ερυθροποίηση. Είναι, λοιπόν, λογικό σε ασθενείς με ΧΝΝ, και κυρίως τελικού σταδίου, τα επίπεδά της στο πλάσμα να είναι πολύ χαμηλά, γεγονός που συμβάλλει σημαντικά στην αναιμία της νόσου. Έτσι, στους ασθενείς αυτούς χορηγείται εξωγενώς ερυθροποιητίνη.

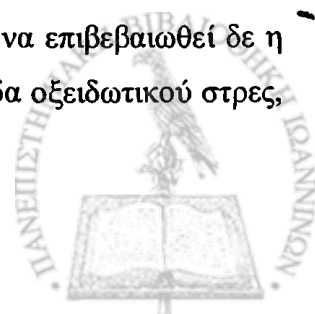
Όλο και περισσότερα δεδομένα υπάρχουν σήμερα που υποστηρίζουν ότι η ερυθροποιητίνη έχει σημαντικές αντιοξειδωτικές και αντιαποπτωτικές ικανότητες στην ουραιμία<sup>170-174</sup>. Οι ιδιότητες αυτές μπορεί να οφείλονται σε διάφορους λόγους. Τα



ερυθροκύτταρα αποτελούν ένα από τα κυριότερα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού μας, αφού περιέχουν μια σειρά από ενζυμικές (σύστημα γλουταθειόνης, δισμουτάση του σουπεροξειδίου, καταλάση), αλλά και μη ενζυμικές (βιταμίνη E, συνένζυμο Q) αντιοξειδωτικές ουσίες. Έτσι η ερυθροποιητίνη, προάγοντας την ερυθροποίηση, ασκεί ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ρόλο. Επίσης, εμμέσως, καταναλώνοντας σίδηρο, η ερυθροποιητίνη βοηθάει σημαντικά στο μετριασμό των δυσμενών συνεπειών από την ενδοφλέβια χορήγηση και υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο<sup>175;176</sup>. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η επίδραση της ερυθροποιητίνης στο οξειδωτικό στρες είναι ευνοϊκή.

### 3.3 Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στην εγκατάσταση και εξέλιξη της νεφρικής νόσου

Το οξειδωτικό στρες φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην εγκατάσταση όσο κυρίως και στην εξέλιξη της ΧΝΝ. Τα δεδομένα που υπάρχουν σχετικά με την συμμετοχή του οξειδωτικού στρες στη εγκατάσταση της νόσου αφορούν κυρίως πειραματικές μελέτες σε κουνέλια. Έτσι ο Nath και οι συνεργάτες του<sup>177-179</sup> σχεδίασαν μια σειρά πειραματικών μελετών στις οποίες χορηγούσαν σε κουνέλια διατροφή ανεπαρκή σε βασικές αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως το σελήνιο και η βιταμίνη E. Το σελήνιο αποτελεί συνπαράγοντα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, η οποία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί ένα από τα βασικά ένζυμα (μαζί με την καταλάση), απομάκρυνσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η δε βιταμίνη E αποτελεί βασική αντιοξειδωτική ουσία, ιδιαίτερα για την προστασία των φωσφολιπιδίων από την υπεροξείδωση. Δημιουργήθηκαν δηλαδή συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού στρες. Παρατηρήθηκε, λοιπόν, ότι τα κουνέλια, των οποίων η διατροφή δεν περιείχε αυτές τις βασικές αντιοξειδωτικές ουσίες, είχαν μειωμένο σωματικό βάρος σε σύγκριση με εκείνα των οποίων η διατροφή τους ήταν πλήρης, ενώ το μέγεθος των νεφρών τους ήταν σημαντικά μεγαλύτερο. Περαιτέρω δε μελέτες έδειξαν ότι οι νεφροί των κουνελιών αυτών είχαν υποστεί σημαντικές δομικές αλλά και λειτουργικές διαταραχές. Οι μεν δομικές διαταραχές αφορούσαν κυρίως βλάβες του σωληναριοδιάμεσου ιστού και κυρίως αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου, οι δε λειτουργικές αφορούσαν σημαντική μείωση του ρυθμού πειραματικής διήθησης, της νεφρικής αιματικής ροής, αλλά και εμφάνιση πρωτεϊνουρίας. Πιο ενδελεχής μάλιστα έλεγχος των κουνελιών που υποβάλλονταν στη διαιτητική έλλειψη των συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών παραγόντων, ανέδειξε την ενεργοποίηση της σύνθεσης του DNA και κυρίως την έκφραση γονιδίων, όπως του TGFβ1 mRNA, μιας κυτοκίνης που προάγει τη σύνθεση του κολλαγόνου. Για να επιβεβαιωθεί δε η άμεση συσχέτιση της ενεργοποίησης του TGFβ1 με τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες,



διάφορες κυτταρικές σειρές εκτέθηκαν σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, μη τοξικές, υπεροξειδίου του υδρογόνου. Διαπιστώθηκε εκ νέου η ενεργοποίηση της έκφρασης και της εναπόθεσης του κολλαγόνου. Τα παραπάνω πειράματα υποδηλώνουν ότι ήπια έκθεση σε  $H_2O_2$  μπορεί να αποτελέσει το έναυσμα για μορφολογικές αλλαγές στο νεφρό, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν τελικά σε νεφρική ανεπάρκεια. Σημαντικό ρόλο φαίνεται ότι διαδραματίζουν διάφοροι αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες, με πιο σημαντικό τον TGFβ1.

Το οξειδωτικό όμως στρες φαίνεται να συμμετέχει και μάλιστα ενεργά, στην εξέλιξη της νεφρικής νόσου. Η επίδραση των οξειδωτικών παραγόντων στη νεφρική αιματική ροή, στην εμφάνιση της λευκωματουρίας, στην έκφραση διαφόρων γονιδίων, στην απόπτωση, αλλά και στη φλεγμονή αποτελούν μερικούς μόνο από τους τρόπους συμμετοχής του οξειδωτικού στρες στη νεφρική νόσο.

### *Οξειδωτικό στρες και διαταραχές της νεφρικής αιμάτωσης*

Οι διάφοροι οξειδωτικοί παράγοντες, ανάλογα με το είδος τους και τη δόση τους, μπορούν να προκαλέσουν στο νεφρό διαφόρου τύπου αιμοδυναμικές διαταραχές<sup>180</sup>. Έτσι, αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα τόσο την ενεργοποίηση αγγειοδιασταλτικών προσταγλαδινών (όπως η προστακυκλίνη), όσο και την ενεργοποίηση αγγειοσυσπαστικών ουσιών, όπως οι θρομβοξάνες, επηρεάζοντας έτσι τη νεφρική αιματική ροή. Συγκεκριμένοι, επίσης, οξειδωτικοί παράγοντες σχετίζονται με συγκεκριμένα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, χαμηλές δόσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου μπορούν να ενεργοποιήσουν τη γουανυδιλική κυκλάση, με αποτέλεσμα το σχηματισμό cGMP και αγγειοδιαστολή. Το ανιόν του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), όπως ήδη έχει αναφερθεί, αποτελεί ένα ικανό “εκκαθαριστή” του NO, το οποίο, όπως γνωρίζουμε, ασκεί σημαντική αγγειοδιασταλτική δράση, με αποτέλεσμα τα αυξημένα επίπεδα  $O_2^{\cdot-}$  να προάγουν την αγγειοσύσπαση. Η ενδοθηλίνη, επίσης, ένας σημαντικός αγγειοσυσπαστικός παράγοντας, μπορεί να ενεργοποιηθεί από διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες με αποτέλεσμα σημαντικές αιμοδυναμικές διαταραχές. Είναι, λοιπόν, προφανές ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να προάγει τόσο την αγγειοσύσπαση, όσο και την αγγειοδιαστολή. Το αποτέλεσμα της επίδρασης των παραγόντων αυτών στη νεφρική αιματική ροή εξαρτάται από το είδος της υποκείμενης διαταραχής και τη ανατομική θέση του νεφρού στην οποία αυτή εκφράζεται. Έτσι επίδραση αγγειοδιασταλτικών παραγόντων στο προσαγωγό αρτηρίδιο του σπειράματος έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ενδοσπειραματικής πίεσης και της σπειραματικής διήθησης, μεταβολές που σε μακροχρόνια βάση μπορούν να εμπλέκονται στην εξέλιξη της





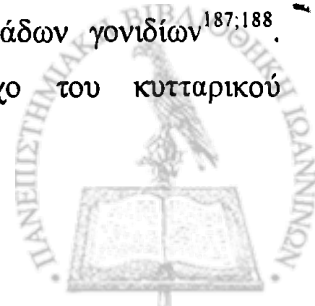
νεφρικής βλάβης. Αντιθέτως, όταν η κυρίαρχη διαταραχή αφορά κυρίως την παραγωγή αγγειοσυσπαστικών ουσιών παρατηρείται ιστική υποξία που με τη σειρά της μπορεί να κινητοποιήσει μηχανισμούς φλεγμονής και ίνωσης.

### ***Οξειδωτικό στρες και λευκωματουρία***

Η παραγωγή οξειδωτικών παραγόντων σε ικανές ποσότητες μπορεί να προάγει τη λευκωματουρία, κυρίως, διαμέσου άμεσης τοξικής βλάβης στις δομές που ελέγχουν το σπειραματικό ηθμό και συγκεκριμένα στη βασική μεμβράνη, τη στιβάδα των επιθηλιακών και τη στιβάδα των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>181;182</sup>. Κατά την εξέλιξη όμως της ΧΝΝ, είναι λογικό, η παραγωγή των οξειδωτικών παραγόντων να μην φτάνει σε αυτά τα τοξικά/κυτταρολυτικά επίπεδα. Και μικρότερα όμως επίπεδα οξειδωτικών παραγόντων μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στην εκλεκτική σπειραματική διήθηση. Ο Yoshioka και οι συνεργάτες του, παρατήρησαν ότι η έκχυση μικρών συγκεντρώσεων υπεροξειδίου του υδρογόνου στη νεφρική αρτηρία, οι οποίες ωστόσο δεν έχουν άμεσες τοξικές ή αιμοδυναμικές επιδράσεις, μπορεί να προκαλέσει αύξηση έως και 50% της νεφρικής απέκκρισης λευκώματος<sup>183</sup>. Περαιτέρω δε μελέτες έδειξαν ότι αυτές οι διαταραχές μπορεί να είναι αποτέλεσμα της τροποποίησης των πρωτεϊνών της βασικής μεμβράνης ή των υποδοχέων (υποδοχείς ιντεκρινών) που συνδέουν τη βασική μεμβράνη με τη στιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα τη διαταραχή του σπειραματικού ηθμού<sup>184;185</sup>. Πέρα από αυτή την άμεση συσχέτιση του οξειδωτικού στρες με την πρόκληση νεφρικής βλάβης, το αποτέλεσμα της δράσης του οξειδωτικού στρες, δηλαδή η εμφάνιση λευκωματουρίας, φαίνεται ότι εμπλέκεται από εκεί και πέρα στην εξέλιξη της νεφρικής νόσου. Όλο και περισσότερα δεδομένα υπάρχουν σήμερα που συσχετίζουν την λευκωματουρία με την επιδείνωση της νεφρικής βλάβης, κυρίως με μηχανισμούς που έχουν να κάνουν με την πρόκληση φλεγμονής και ίνωσης<sup>186</sup>.

### ***Οξειδωτικό στρες, γονιδιακή έκφραση και απόπτωση***

Έντονη έρευνα στο πεδίο αυτό την τελευταία δεκαετία έδειξε ότι η έκθεση σε χαμηλά, μη-θανατηφόρα επίπεδα, οξειδωτικού στρες (κυρίως σε ROS), έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διεργασιών μεταγωγής σημάτων, τη διέγερση της σύνθεσης του DNA και την τροποποίηση της δράσης πολλών πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων και μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ρυθμίζουν τη συγχρονισμένη έκφραση δεκάδων γονιδίων<sup>187;188</sup>. Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι διαταραχές στον έλεγχο του κυτταρικού



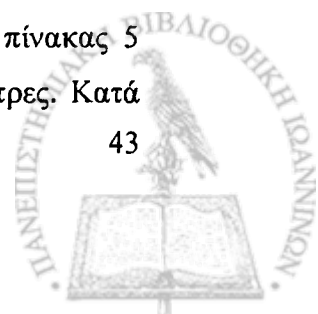
πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων, ενώ όταν τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες ξεπεράσουν την αμυντική ικανότητα των κυττάρων μπορεί να προκληθεί κυτταρικός θάνατος, είτε με τη διαδικασία της απόπτωσης είτε με νέκρωση<sup>189;190</sup>.

### *Οξειδωτικό στρες και φλεγμονή*

Η ιστική φλεγμονή στο νεφρικό παρέγχυμα προϋποθέτει την χημειοταξία των λευκοκυττάρων, την προσκόλλησή τους στην ενδοθηλιακή στιβάδα, την ενεργοποίησή τους και τελικά τη μετανάστευσή τους διάμεσου του ενδοθηλίου και της βασικής μεμβράνης στους περιβάλλοντες ιστούς<sup>191;192</sup>. Αυτή η διαδικασία απαιτεί την ενεργοποίηση διαφόρων χημειοτακτικών παραγόντων, αλλά και μορίων προσκόλλησης. Και σε αυτή την περίπτωση ο ρόλος του οξειδωτικού στρες μπορεί να είναι σημαντικός. Για παράδειγμα, χημειοτακτικοί παράγοντες, όπως οι MCP-1 και IL-8, αλλά και μόρια προσκόλλησης, όπως τα ICAM-1 και VCAM-1, μπορούν να ενεργοποιηθούν από οξειδωτικούς παράγοντες, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες<sup>193</sup>. Με αυτό τον τρόπο το οξειδωτικό στρες μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο και να προάγει τη φλεγμονώδη αντίδραση, που με την σειρά της συμμετέχει ενεργά στην εξέλιξη της νεφρικής νόσου. Ένας από τους κύριους μηχανισμούς, διαμέσου του οποίου το επιτυγχάνει αυτό, είναι η επίδραση που ασκεί στον μεταγραφικό παράγοντα NFκB<sup>193</sup>. Ο NFκB παίζει ένα κεντρικό ρόλο στη διεργασία της φλεγμονής, αφού αυτός ο παράγοντας μπορεί να ενεργοποιήσει ένα μεγάλο αριθμό από μόρια προσκόλλησης και κυτοκίνες. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η δράση του παράγοντα NFκB αναστέλλεται από τον IκB. Σε συνθήκες όμως αυξημένου οξειδωτικού στρες ενεργοποιείται η κινάση που φωσφορυλιώνει τον IκB, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η δράση του, να ενεργοποιείται ο NFκB, ο οποίος και μεταναστεύει στον πυρήνα του κυττάρου όπου ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που παίρνουν μέρος στη φλεγμονή.

### **3.4 Δείκτες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες στη ΧΝΝ**

Έως σήμερα έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες στην ουραιμία. Όπως, όμως, έχει ήδη αναφερθεί, η άμεση ανίχνευση των οξειδωτικών παραγόντων είναι πολύ δύσκολο να γίνει, καθώς τα περισσότερα από τα μόρια αυτά παράγονται σε πολύ μικρές ποσότητες, αλλά και είναι, επίσης, πολύ δραστικά που άμεσα εξαφανίζονται. Έτσι αυτό που συνήθως ανιχνεύουμε είναι σταθερά προϊόντα αντίδρασης των οξειδωτικών παραγόντων με τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και το DNA. Ο πίνακας 5 συνοψίζει τους πιο σημαντικούς από τους δείκτες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες. Κατά



καιρούς, όπως αναφέρεται στη συνέχεια, έγιναν διάφορες προσπάθειες ανίχνευσης ορισμένων από αυτών και σε ασθενείς με ουραιμία<sup>128;194</sup>.

<b>Πίνακας 5. Δείκτες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες</b>	
<p><b>Λιπίδια</b></p> <p>Μηλονική διαλδεύδη και άλλες αλδεύδες</p> <p>Λιπιδιακές υδροπεροξειδάσες</p> <p>Οξειδωμένες χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL)</p> <p>Τελικά προϊόντα προηγμένης λιπιδιακής υπεροξείδωσης (ALE)</p> <p>F<sub>2</sub> ισοπροστάνια</p> <p><b>Υδατάνθρακες</b></p> <p>Αλδεύδες</p> <p>Τελικά προϊόντα προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGEs)</p>	<p><b>Πρωτεΐνες</b></p> <p>Οξείδωση θειολών</p> <p>Καρβονύλια</p> <p>Τελικά προϊόντα οξείδωσης πρωτεϊνών (AOPP)</p> <p><b>Αμινοξέα</b></p> <p>Κυστεΐνη/Κυστίνη</p> <p>Ομοκυστεΐνη/Ομοκυστίνη</p> <p>3-χλωροτυροσίνες</p> <p>3-νιτροτυροσίνες</p> <p><b>DNA</b></p> <p>8 υδροξυ 2 δεοξυγουανίνη</p>

#### **Λιπιδιακή υπεροξείδωση στην ουραιμία**

Πολλοί ερευνητές, με τη χρήση αρκετά ευαίσθητων και ειδικών μεθόδων, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι στο πλάσμα των ασθενών με ΧΝΝ υπάρχουν υψηλότερα επίπεδα οξειδωμένων λιπιδίων σε σύγκριση με τα επίπεδα των υγιών ατόμων. Από αρκετά χρόνια είναι γνωστό ότι τα επίπεδα δύο σημαντικών προϊόντων της λιπιδιακής υπεροξείδωσης, της μηλονικής διαλδεύδης (MDA) και της 4-υδροξυνοενάλης (4-HNE), είναι αυξημένα στους ουραιμικούς ασθενείς<sup>195-202</sup>. Πρόσφατες, επίσης, μελέτες έδειξαν ότι στο πλάσμα όχι μόνο των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών<sup>200;203-207</sup> αλλά και των χρόνιων, μη αιμοκαθαιρόμενων, νεφροπαθών<sup>203;208;209</sup>, τα επίπεδα των F<sub>2</sub> ισοπροστανίων είναι αυξημένα και υπάρχει



σημαντική θετική συσχέτιση αυτών των επιπέδων με το βαθμό της έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας. Τα F<sub>2</sub> ισοπροστάνια αποτελούν μια ομάδα προϊόντων που προκύπτουν από μη ενζυματική, προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες, υπεροξειδωση του αραχιδονικού οξέος<sup>210</sup>, αποτελώντας έτσι ένα πολύ ευαίσθητο δείκτη της λιπιδιακής υπεροξειδωσης. Το ενδιαφέρον όμως των ερευνητών, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, στρέφεται στην ανίχνευση της οξειδωτικά τροποποιημένης LDL του πλάσματος των ουραιμικών ασθενών, καθώς είναι γνωστή η συσχέτιση της οξειδωμένης LDL με την αθηρογένεση. Διάφορες μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι στο πλάσμα των ουραιμικών ασθενών τα επίπεδα της οξειδωμένης LDL είναι αυξημένα σε σύγκριση με εκείνα των υγιών ατόμων<sup>211-213</sup>.

Φαίνεται ότι η μελέτη του φαινομένου της λιπιδιακής υπεροξειδωσης παρέχει αρκετές πληροφορίες σχετικά με τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με ΧΝΝ. Βασικά μειονεκτήματα αποτελούν ο μικρός χρόνος ημιζωής των προϊόντων της λιπιδιακής υπεροξειδωσης, καθώς επίσης και το γεγονός ότι η πιο σημαντική οξείδωση των λιπιδίων λαμβάνει χώρα στο τοίχωμα των αγγείων και όχι στο πλάσμα.

#### *Οξειδωτικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών στην ουραιμία*

Οξειδωτικά τροποποιημένες πρωτεΐνες του πλάσματος και αμινοξέα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως ευαίσθητοι δείκτες του αυξημένου οξειδωτικού στρες στην ουραιμία. Μάλιστα, ο σχετικά μεγάλος χρόνος ημιζωής των πρωτεϊνών, ο εύκολος προσδιορισμός τους, αλλά και η καλή γνώση των βιοχημικών δρόμων που ευοδώνουν την οξείδωση των πρωτεϊνών και των αμινοξέων, βοηθούν στην πιο λεπτομερή μελέτη του φαινομένου του οξειδωτικού στρες σε σύγκριση με τη χρησιμοποίηση των λιπιδίων του πλάσματος.

Η ανίχνευση των οξειδωμένων τυροσινών αποτελεί ένα ευαίσθητο και ειδικό δείκτη αυξημένου οξειδωτικού στρες στην ουραιμία. Ειδικότερα, η οξείδωση των τυροσινών μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό 3-χλωροτυροσινών, 3-νιτροτυροσινών ή διτυροσινών ανάλογα με το αν το κυρίαρχο οξειδωτικό μέσο είναι το υποχλωριώδες οξύ, οι δραστικές μορφές αζώτου ή μια ελεύθερη ρίζα (όπως η OH<sup>•</sup>), αντίστοιχα. Έτσι ο Himmelfarb και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν ότι οι πρωτεΐνες του πλάσματος των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών περιέχουν αυξημένα επίπεδα χλωροτυροσινών, αλλά όχι νιτροτυροσινών ή διτυροσινών<sup>214</sup>. Δεδομένο μάλιστα ότι οι χλωροτυροσίνες αποτελούν ειδικά προϊόντα αντιδράσεων που καταλύονται από τη μυελοπεροξειδάση, η παρουσία τους υποδηλώνει ότι η φαγοκυτταρική ενεργοποίηση έχει ένα βασικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες της ουραιμίας. Ιδιαίτερα μάλιστα το φαινόμενο

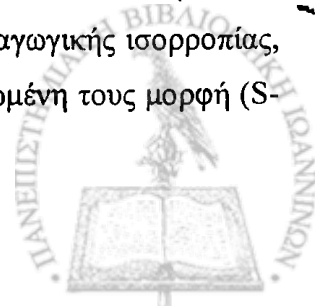


της νίτρωσης μελετήθηκε και σε ιστούς ασθενών με ΧΝΝ. Έτσι, αυξημένα επίπεδα νιτροτυροσινών ανιχνεύτηκαν στους νεφρούς ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια<sup>64</sup>.

Ένας πολύ ευαίσθητος δείκτης εκτίμησης του οξειδωτικού στρες στην ουραιμία, όπως ήδη έχει αναφερθεί, είναι ο προσδιορισμός των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών του πλάσματος. Διάφορες μελέτες έδειξαν υψηλά επίπεδα καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών του πλάσματος στους ουραιμικούς ασθενείς και κυρίως στους αιμοκαθαιρόμενους, συγκριτικά με τα υγιή άτομα<sup>95;106;208;215;216</sup>, υποδηλώνοντας έτσι ότι στους ασθενείς αυτούς υπάρχουν αυξημένα επίπεδα οξειδωτικών παραγόντων. Φαίνεται δε ότι η κύρια πρωτεΐνη του πλάσματος που υφίσταται καρβονυλίωση είναι η αλβουμίνη<sup>107;217</sup>. Ιδιαίτερα μάλιστα τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί στον προσδιορισμό των AGEs, που όπως έχει ήδη αναφερθεί, προέρχονται από την αντίδραση προϊόντων αυτοοξειδωσης των υδατανθράκων, τα οποία είναι καρβονύλια, με συγκεκριμένα αμινοξέα των πρωτεϊνών. Βρέθηκε, λοιπόν ότι οι ουραιμικοί ασθενείς έχουν υψηλά επίπεδα AGEs<sup>96;218-226</sup>, ένα γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό, αφού οι ενώσεις αυτές σχετίζονται άμεσα με την αθηροσκλήρωση, όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια. Το φαινόμενο αυτό μάλιστα έχει ιδιαίτερα μελετηθεί και σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ΠΚ, καθώς τα διαλύματα γλυκόζης που χρησιμοποιούνται προάγουν το σχηματισμό AGEs στην περιτοναϊκή κοιλότητα, ένα εύρημα που μπορεί μακροπρόθεσμα να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη λειτουργία της περιτοναϊκής μεμβράνης<sup>154;156;227-229</sup>.

Υπάρχουν, επίσης, μια σειρά από μελέτες που αναφέρουν την ύπαρξη αυξημένων επιπέδων των τελικών προϊόντων οξειδωσης των πρωτεϊνών (AOPP, advanced oxidation protein products) στους ασθενείς με ΧΝΝ<sup>219;221;230-232</sup>. Τα AOPP αποτελούν πολύ εκλεκτικούς δείκτες ενεργοποίησης των φαγοκυττάρων. Υπάρχουν πράγματι πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι το υποχλωριώδες οξύ που παράγεται από τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα, *in vitro*, μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό AOPP παρόμοιων με αυτά που παρατηρούνται στους ουραιμικούς ασθενείς *in vivo*<sup>231</sup>. Υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις ότι ο ρόλος τους στην παθοφυσιολογία της ΧΝΝ και στις επιλοκές που σχετίζονται με την ΑΚΘ μπορεί να είναι πολύ σημαντικός<sup>233</sup>.

Τέλος, στους ασθενείς με ΧΝΝ και κυρίως σε αυτούς που είναι ενταγμένοι σε πρόγραμμα ΑΚΘ, μελετήθηκαν ιδιαίτερα τα επίπεδα των θειολικών ομάδων των πρωτεϊνών του πλάσματος τα οποία και βρέθηκαν να είναι σημαντικά μειωμένα σε σύγκριση με τα υγιή άτομα<sup>106;128;201;202;208;216</sup>. Οι θειόλες επιτελούν ένα σημαντικό ρόλο, τόσο ενδοκυττάριο όσο και εξωκυττάριο και συμμετέχουν ενεργά στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, καθώς έχουν τη δυνατότητα μετατροπής από την ανηγμένη στην οξειδωμένη τους μορφή (S-



H/S-S). Έτσι διαμέσου της ομάδας -SH συμβάλλουν ενεργά στην απομάκρυνση τόσο των ελευθέρων ριζών όσο και των οξειδωτικών μορίων, όπως το HOCl, που προέρχονται από τη δράση της μυελοπεροξειδάσης<sup>234</sup>. Η αλβουμίνη μάλιστα, καθότι η συγκέντρωσή της στο πλάσμα είναι μεγάλη, προμηθεύει, σχεδόν, το σύνολο των θειολικών ενώσεων του πλάσματος. Δεδομένου, επίσης, ότι η παρουσία άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών στο πλάσμα είναι πολύ μικρή, ο Halliwell διατύπωσε την άποψη ότι η αλβουμίνη αποτελεί την κύρια γραμμή εξωκυττάριας άμυνας έναντι του οξειδωτικού στρες στο πλάσμα<sup>144</sup>. Έτσι, μελέτες έδειξαν ότι σε ασθενείς με ΧΝΝ που υποβάλλονται σε ΑΚΘ τα επίπεδα της οξειδωμένης αλβουμίνης είναι αυξημένα συγκριτικά με τα υγιή άτομα<sup>217,235</sup>. Αλλά και σε μη αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, η αναλογία της οξειδωμένης μορφής της αλβουμίνης φαίνεται να αυξάνεται καθώς η νεφρική λειτουργία επιδεινώνεται<sup>236</sup>.

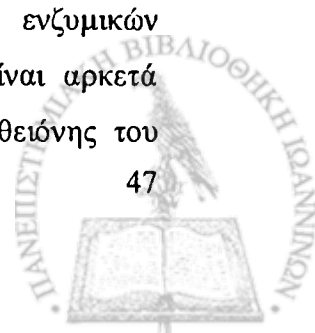
Συμπερασματικά όλες αυτές οι μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι ο προσδιορισμός των οξειδωμένων αμινοξέων και πρωτεϊνών αποτελεί ένα πολύ ευαίσθητο δείκτη εκτίμησης του οξειδωτικού στρες στην ουραιμία.

#### **Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών ουσιών στην ουραιμία**

Στη ΧΝΝ έχουν μελετηθεί τόσο η ενεργότητα των ενζυμικών αντιοξειδωτικών συστημάτων (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, δισμουτάση του σουπεροξειδίου, καταλάση), αλλά και τα επίπεδα αρκετών μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών ενώσεων (βιταμίνη C, βιταμίνη E, ουρικό οξύ, πρωτεϊνικές θειόλες).

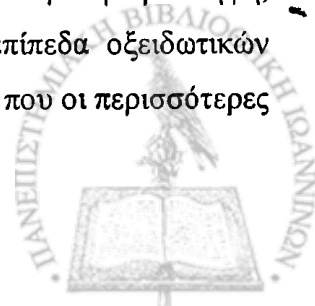
Μια αρχική παρατήρηση, εδώ και αρκετά χρόνια, είναι ότι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (total antioxidant status, TAS) του πλάσματος των ασθενών με ΧΝΝ και κυρίως αυτών που υποβάλλονται σε ΑΚΘ, είναι αυξημένη σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, ένα γεγονός που έρχεται σε πλήρη αντίθεση με όσα έχουν ήδη αναφερθεί. Γρήγορα, όμως, διαπιστώθηκε ότι αυτό το εύρημα δεν αντιπροσωπεύει την πραγματικότητα και ότι οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα του ουρικού οξέος του πλάσματος των ασθενών αυτών, τα οποία μάλλον δεν φαίνεται ότι προσφέρουν επαρκή αντιοξειδωτική προστασία απέναντι στα αυξημένα επίπεδα του οξειδωτικού στρες της ουραιμίας<sup>153;195;197;237,238</sup>. Έτσι ο προσδιορισμός της TAS δεν αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος στην ουραιμία<sup>209</sup>.

Όσον αφορά τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των βασικών ενζυμικών αντιοξειδωτικών ουσιών σε ασθενείς με ΧΝΝ, τα πράγματα φαίνεται να είναι αρκετά πολύπλοκα<sup>239;240</sup>. Έτσι, λοιπόν, η ενεργότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης του



πλάσματος φαίνεται να είναι μειωμένη, τόσο σε ασθενείς με ΧΝΝ μη αιμοκαθαιρόμενους αλλά κυρίως σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, σε σύγκριση με τα υγιή άτομα<sup>141;142;241</sup>. Αυτό το εύρημα, πιθανά, είναι αποτέλεσμα της μειωμένης σύνθεσης του ενζύμου από τα κατεστραμμένα νεφρικά κύτταρα. Ωστόσο, η ενεργότητα της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου του πλάσματος αυξάνεται σημαντικά σε ασθενείς με προ τελικό στάδιο νεφρικής νόσου και κυρίως στην ΑΚΘ, σε μια προσπάθεια να απομακρύνει τα ανιόντα του σουπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) (αντίδραση 4) και να προλάβει έτσι την πρόκληση τοξικών βλαβών. Αποτέλεσμα της δράσης των δύο αυτών ενζύμων είναι η αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) (αντιδράσεις 4, 6). Και σε αυτό το σημείο αρχίζει ο ρόλος της καταλάσης, η οποία, όπως έχουμε ήδη αναφέρει καταλύει τη μετατροπή του  $H_2O_2$  σε νερό (αντίδραση 5). Βρέθηκε, λοιπόν, ότι η ενεργότητα της καταλάσης του πλάσματος σε μη αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς με ΧΝΝ, είναι αυξημένη, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση του  $H_2O_2$ . Αντιθέτως, στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς η ενεργότητα της καταλάσης είναι μειωμένη με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του  $H_2O_2$ . Το γιατί συμβαίνει αυτό δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί, φαίνεται πάντως ότι υπάρχει μια διαταραχή της σύνθεσης του ενζύμου<sup>242</sup>. Ενδιαφέρον πάντως είναι το εύρημα ότι στους ασθενείς που υποβάλλονται σε ΠΚ, ενώ η ενεργότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης είναι μειωμένη και της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου αυξημένη, όπως και στην ΑΚΘ, η ενεργότητα της καταλάσης φαίνεται ότι είναι αυξημένη<sup>243</sup>. Τέλος, ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των ερυθροκυττάρων σε υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και δισμουτάση του σουπεροξειδίου αποτελεί ένα πολύ καλό δείκτη της ανεπάρκειας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών αυτών των ασθενών<sup>244;245</sup>.

Ιδιαίτερη όμως έμφαση, ιδίως τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί στον προσδιορισμό βασικών, μη ενζυμικών, αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως η βιταμίνη C και E, στην ουραιμία. Η βιταμίνη C, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη που αποτελεί ένα από τα κύρια αντιοξειδωτικά του πλάσματος, καθώς δρά ως «εκκαθαριστής» ελευθέρων ριζών και κυρίως των  $O_2^-$  και  $OH^-$ . Η δε βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη με σημαντικό ρόλο στην αναστολή της λιπιδιακής υπεροξειδωσης<sup>148</sup>. Έτσι, διάφορες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα της βιταμίνης C είναι ελαττωμένα στους ασθενείς με ΧΝΝ και κυρίως στους ασθενείς που υποβάλλονται σε μία από τις μεθόδους υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας. Οι λόγοι για τη μείωση αυτή είναι πολλοί: μειωμένη πρόσληψη, αυξημένη απομάκρυνση και αυξημένη κατανάλωση από τα υψηλά επίπεδα οξειδωτικών παραγόντων<sup>148-152;158-160;240;241;246-248</sup>. Όσον αφορά τη βιταμίνη E, παρόλο που οι περισσότερες



μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδά της δεν είναι ιδιαίτερα χαμηλά στην ουραιμία σε σύγκριση με τους υγιή άτομα<sup>148;197;203;247;248</sup>, εντούτοις, όπως θα δούμε στη συνέχεια, αυτοί οι άρρωστοι φαίνεται να ωφελούνται από τη χορήγησή της<sup>249;250</sup>.

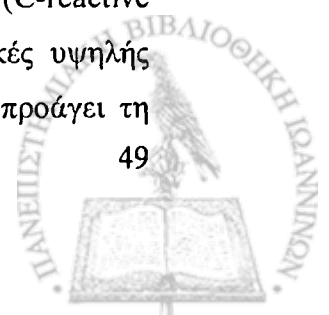
Τέλος, έχει ήδη αναφερθεί, όλες οι μελέτες συμφωνούν πως τα επίπεδα των θειολικών ομάδων των πρωτεϊνών του πλάσματος των ασθενών με ΧΝΝ είναι σημαντικά μειωμένα σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, με αποτέλεσμα την ανεπάρκεια της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος αυτών των ασθενών<sup>106;128;201;208;251</sup>.

### 3.5 Οξειδωτικό στρες και φλεγμονή. Ποιος ο ρόλος τους στις μακροχρόνιες επιπλοκές της ΧΝΝ;

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελούν την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας στους ασθενείς με ΧΝΝ και ιδιαίτερα σε ασθενείς τελικού σταδίου ή σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ΑΚΘ. Υπολογίζεται δε ότι οι θάνατοι καρδιαγγειακής αιτιολογίας αγγίζουν το 50% της συνολικής θνησιμότητας σε αυτό τον πληθυσμό<sup>126;127;252-254</sup>. Η ύπαρξη παραδοσιακών παραγόντων κινδύνου, όπως η υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία και ο σακχαρώδης διαβήτης, εν μέρει μόνο μπορούν να εξηγήσουν την έκταση και τη σοβαρότητα αυτού του προβλήματος<sup>129-131</sup>. Έτσι τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερο δίνεται έμφαση στην ύπαρξη «μη κλασικών» παραγόντων κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, μεταξύ των οποίων προεξάρχουσα είναι η σημασία της χρόνιας φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες<sup>132;255-257</sup>. Φαίνεται δε ότι η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες είναι αλληλένδετα μεταξύ τους και ότι η εμφάνιση του ενός προάγει και την εμφάνιση του άλλου, δημιουργώντας έτσι ένα φαύλο κύκλο<sup>258</sup>.

Η φλεγμονή, όπως είναι γνωστό, αποτελεί τη φυσιολογική απάντηση του οργανισμού σε διεργασίες που έχουν ως αποτέλεσμα κυτταρική και ιστική βλάβη. Χαρακτηρίζεται από πολύπλοκες διεργασίες αύξησης της σύνθεσης και έκκρισης διαφόρων ουσιών (μεσολαβητές της φλεγμονής), αύξησης της διαπερατότητας των αγγείων, καθώς και από συσσώρευση έμμορφων στοιχείων του αίματος (πολυμορφοπύρηνα, μονοπύρηνα/μακροφάγα).

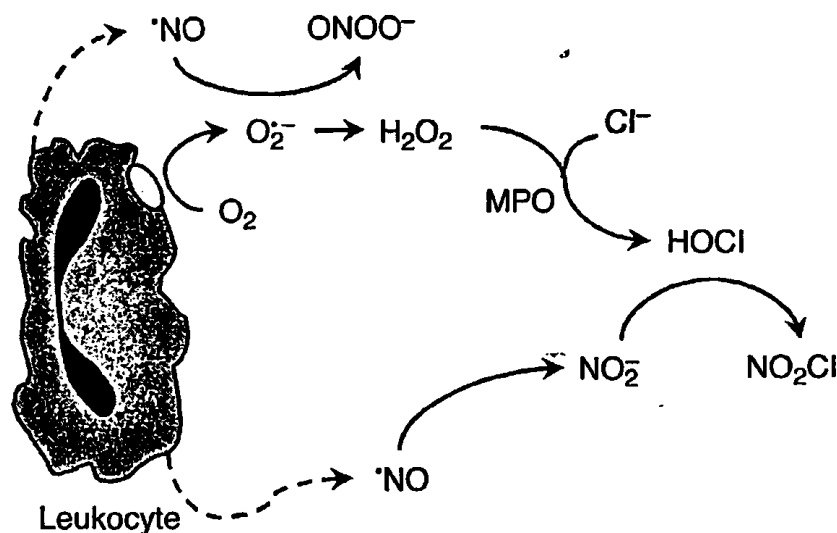
Η ΧΝΝ και κυρίως οι μέθοδοι υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, εδώ και αρκετά χρόνια, είναι γνωστό ότι αποτελούν καταστάσεις που προάγουν τη φλεγμονή<sup>259-261</sup>. Έμμεσος δείκτης αυτού του φαινομένου αποτελεί η αύξηση βιοχημικών δεικτών φλεγμονής στον ορό των ασθενών αυτών, όπως για παράδειγμα η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP)<sup>143;262;263</sup>, ιδιαίτερα μάλιστα όταν αυτή προσδιορίζεται με τεχνικές υψηλής ευαισθησίας<sup>264</sup>. Ιδιαίτερα δε η ΑΚΘ αποτελεί μια διαδικασία που μπορεί να προάγει τη





φλεγμονή με διάφορους μηχανισμούς, όπως η χρόνια επαφή και ενεργοποίηση των μονοκυττάρων/μακροφάγων με τις μεμβράνες αιμοκάθαρσης, αλλά και η παρουσία ενδοτοξινών στα διαλύματα αιμοκάθαρσης που μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και την απελευθέρωση μεσολαβητών φλεγμονής, όπως η ιντερλευκίνη-1 (IL-1), ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου (TNF- $\alpha$ )<sup>265-272</sup>. Φαίνεται δε ότι αυτή η χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση της ουραιμίας εμπλέκεται στις μακροχρόνιες επιπλοκές της νόσου, όπως η αθηροσκλήρωση<sup>143,273,274</sup> και η αμυλοείδωση<sup>275</sup>.

Τα αυξημένα επίπεδα του οξειδωτικού στρες στην ουραιμία φαίνεται ότι αποτελούν τον συνδετικό κρίκο ανάμεσα στη λευκοκυτταρική ενεργοποίηση της φλεγμονής και την πρόκληση τοξικής βλάβης. Η ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας σειράς από οξειδωτικούς παράγοντες, διαμέσου της ενεργοποίησης της iNOS συνθετάσης, της μυελοπεροξειδάσης και της NADPH οξειδάσης (σχήμα 7), που με τη σειρά τους τροποποιούν τα μοριακά συστατικά του κυττάρου, όπως εκτενέστατα έχει αναφερθεί.



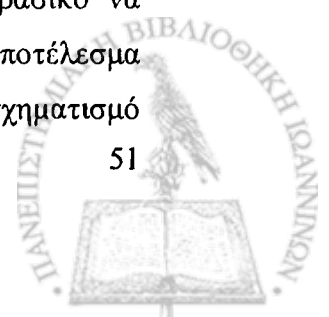
Σχήμα 7. Ενεργοποίηση του λευκοκυττάρου και υπερπαραγωγή ROS και RNS

Έτσι, η ανεύρεση θετικής συσχέτισης μεταξύ διαφόρων δεικτών φλεγμονής, όπως η CRP και η IL-6 και οξειδωτικών παραγόντων, όπως η μηλονική διαλδεύδη, τα F<sub>2</sub>

ισοπροστάνια και τα AGEs στην ουραιμία, αποτελεί έμμεσο δείκτη της συνύπαρξης και της αλληλοσυσχέτισης αυτών των δύο καταστάσεων<sup>146;204;205;208;220;263;276-280</sup>.

Οι βασικές επιπλοκές από τη μακροχρόνια δράση της φλεγμονής και των αυξημένων επιπέδων των οξειδωτικών παραγόντων στην ουραιμία είναι η αθηροσκλήρωση και η αμυλοείδωση.

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί πλέον μια αναγνωρισμένη χρόνια φλεγμονώδη διεργασία<sup>281</sup>. Πρώτος ο Steinberg και οι συνεργάτες του το 1989 ανέπτυξαν την υπόθεση ότι η αθηρογενετική δράση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL), αυξανόταν σημαντικά μετά την οξειδωτική τροποποίησή της<sup>282</sup>. Η οξειδωτικά τροποποιημένη LDL προσλαμβάνεται από ειδικούς υποδοχείς-εκκαθαριστές (scavenger receptors) της επιφάνειας των μονοκυττάρων/μακροφάγων με αποτέλεσμα το σχηματισμό του πρόδρομου κυττάρου της αθηροσκληρωτικής πλάκας, του «αφρώδους κυττάρου»<sup>283</sup>. Από εκεί και πέρα και καθώς η διεργασία της φλεγμονής προοδευτικά κλιμακώνεται, έχουμε το σχηματισμό, διαμέσου πολύπλοκων μηχανισμών, των προχωρημένων αθηροσκληρωτικών βλαβών. Το οξειδωτικό στρες φαίνεται να συμμετέχει ενεργά σε όλη αυτή τη διαδικασία. Από τους διάφορους δείκτες αυξημένου οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν στην ΧΝΝ, τα προϊόντα της λιπιδιακής υπεροξειδωσης φαίνεται ότι συσχετίζονται σημαντικά με την οξειδωτική τροποποίηση των LDL<sup>284</sup>, ένα γεγονός που επιβεβαιώνεται και από ανοσοιστοχημικές αναλύσεις σε αθηροσκληρωτικές πλάκες από ανθρώπινη αορτή οι οποίες ανέδειξαν την παρουσία διάφορων δραστικών αλδευδών σε άμεση συσχέτιση με μακροφάγα και «αφρώδη κύτταρα»<sup>285</sup>. Η μηλονική διαλδεύδη, συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι συνδέεται με αυξημένη επίπτωση καρδιαγγειακών επιπλοκών σε ασθενείς με ΧΝΝ<sup>197;253</sup>. Σημαντικός, επίσης, φαίνεται ότι είναι ο ρόλος των AGEs προϊόντων στην αθηρογένεση της ουραιμίας<sup>128;286-294</sup>. Τα AGEs, διαμέσου σύνδεσης με ειδικούς υποδοχείς (RAGE), προκαλούν την έκφραση διαφόρων μορίων προσκόλλησης, αλλά και τη χημειοταξία των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα<sup>295</sup>. Πρέπει, επίσης, να αναφερθεί ότι ένας φυσικός αναστολέας της δράσης του συμπλέγματος AGE-RAGE είναι το sRAGE (soluble RAGE). Βρέθηκε λοιπόν ότι σε ασθενείς με ΧΝΝ, κυρίως τελικού σταδίου, τα επίπεδα του sRAGE στον ορό αυξάνονται, χωρίς όμως να μπορεί να διευκρινιστεί ακόμη αν αυτό το εύρημα οφείλεται σε μειωμένη νεφρική κάθαρση ή στην κινητοποίηση ενός μηχανισμού προστασίας από τις τοξικές βλάβες των AGE<sup>296</sup>. Είναι επίσης βασικό να επισημανθεί ότι η αλληλεπίδραση των AGEs με τους RAGE υποδοχείς έχει ως αποτέλεσμα και την αυξημένη παραγωγή IL-6 από τα μονοκύτταρα και έμμεσα τον αυξημένο σχηματισμό



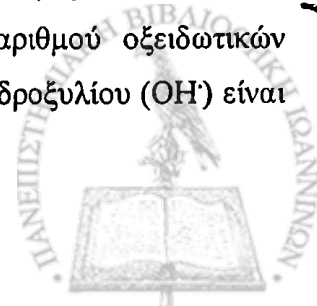
της CRP από το ήπαρ, συμμετέχοντας έτσι στη γένεση της φλεγμονής αλλά και του φαύλου κύκλου ανάμεσα σε αυτή και το οξειδωτικό στρες<sup>263</sup>. Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι η ίδια LDL είναι ένα από τα μόρια που υφίσταται μη ενζυμική γλυκοζυλίωση και μάλιστα, τόσο στο πρωτεϊνικό, όσο και στο λιπιδαιμικό τμήμα της<sup>297</sup>. Έτσι το μόριο καθίσταται επιρρεπές στη οξειδωτική τροποποίηση και στην φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των «αφρωδών κυττάρων» και την αθηρογένεση.

Όσον αφορά την αμυλοείδωση, αυτή αποτελεί μια σοβαρή επιπλοκή που συμβαίνει σε ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών που υποβάλλονται σε μακροχρόνια ΑΚΘ<sup>298</sup>. Σχετίζεται με την εναπόθεση β<sub>2</sub> μικροσφαιρίνης στα οστά και τις αρθρώσεις και μάλιστα για αρκετά χρόνια πριν την εμφάνιση κλινικών και ακτινολογικών ευρημάτων<sup>95</sup>. Παρόλο που η παθογένεια αυτού του τύπου της αμυλοείδωσης δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή, μελέτες έδειξαν ότι πέρα από τη μειωμένη κάθαρση της ουσίας από τους νεφρούς, η βιοχημική τροποποίηση του μορίου της β<sub>2</sub> μικροσφαιρίνης στο ουραιμικό περιβάλλον συνεισφέρει σημαντικά στην παθογενετικότητά του<sup>299;300</sup>. Έτσι, σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ΑΚΘ η ισομορφή της β<sub>2</sub> μικροσφαιρίνης που αναγνωρίζεται στο αμυλοειδές είναι αποτέλεσμα προοδευτικών διεργασιών οξειδωσης και γλυκοζυλίωσης αυτής της πρωτεΐνης<sup>92;275;301</sup>. Το τροποποιημένο μόριο AGE- β<sub>2</sub> μικροσφαιρίνης μπορεί να συνδεθεί με τους AGE υποδοχείς (RAGE) στα μονοκύτταρα, οδηγώντας έτσι στην ενεργοποίησή τους, στην παραγωγή κυτταροκινών και στον περαιτέρω σχηματισμό ROS<sup>302</sup>. Είναι, λοιπόν, προφανές ότι αυτή η συγκεκριμένη μορφή του αμυλοειδούς έχει την ικανότητα να αντιδρά τόσο με αντισώματα που δεσμεύουν τα AGE, όσο και με αντισώματα που προσδέονται στα RAGE<sup>303-305</sup>. Η χρήση, τα τελευταία χρόνια, περισσότερο βιοσυμβατών μεμβρανών αιμοκάθαρσης έχει βοηθήσει σημαντικά στο περιορισμό του φαινομένου της αμυλοείδωσης σε αυτούς τους ασθενείς<sup>306</sup>.

Έτσι, λοιπόν, πρέπει να επισημανθεί ότι ο ρόλος της φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες στη ΧΝΝ και ιδιαίτερα στα τελικά στάδιά της, είναι πολύ σημαντικός για την κατανόηση των μακροχρόνιων και σοβαρών επιπλοκών της νόσου.

### 3.6 Θεραπευτικές στρατηγικές

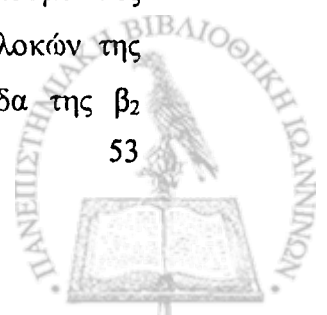
Παρόλο που η συμμετοχή του οξειδωτικού στρες στη ΧΝΝ θεωρείται δεδομένη, η ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών αντιμετώπισης είναι αρκετά δύσκολη υπόθεση. Η δυσκολία αυτή εστιάζεται στο γεγονός ότι το λεγόμενο «οξειδωτικό στρες» δεν είναι ένα φαινόμενο, αλλά η κοινή ονομασία της δράσης ενός μεγάλου αριθμού οξειδωτικών παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί και κυρίως οι ελεύθερες ρίζες του υδροξυλίου (OH<sup>•</sup>) είναι



εξαιρετικά δραστικοί και συχνά δεν προλαβαίνουν να διαχυθούν αλλά αντιδρούν στο σημείο της δημιουργίας τους. Κατά συνέπεια, η αντιμετώπισή τους με αντιοξειδωτικά σκευάσματα είναι δύσκολη και η μόνη στρατηγική αντιμετώπισής τους είναι η αποτροπή της δημιουργίας τους. Εμπόδιο για την ανάπτυξη μιας τέτοιας στρατηγικής αποτελεί η μη ακριβής γνώση των μοριακών μηχανισμών δημιουργίας των ελευθέρων ριζών.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα αυξημένα επίπεδα του οξειδωτικού στρες στη ΧΝΝ οφείλονται τόσο στην αυξημένη παραγωγή οξειδωτικών παραγόντων όσο και στη σημαντική διαταραχή της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού. Έτσι, οι θεραπευτικές στρατηγικές μείωσης του οξειδωτικού στρες στους ασθενείς αυτούς πρέπει να στοχεύουν και στις δύο παραμέτρους. Οι βασικές, λοιπόν, παρεμβάσεις στους ασθενείς αυτούς περιλαμβάνουν<sup>307</sup>: 1) τη χρησιμοποίηση, κατά το δυνατόν, βιοσυμβατών μεμβρανών αιμοκάθαρσης, αλλά και διαλυμάτων υψηλής καθαρότητας (Ultrapure), ελεύθερων ενδοτοξινών, 2) την εφαρμογή της μεθόδου της αιμολιποδιάλυσης και τη χρήση απιονισμένου νερού για την προετοιμασία των διαλυμάτων, 3) τη χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών (όπως οι βιταμίνες C και E και η N-ακετυλκυστεΐνη) και 4) τη χορήγηση ουσιών που πιθανά, έμμεσα, επηρεάζουν το οξειδωτικό στρες (όπως η ερυθροποιητίνη).

Η σταδιακή εξέλιξη της επιστήμης και της τεχνολογίας έδωσε τη δυνατότητα να έχουμε βιοσυμβατότερες μεμβράνες, ασφαλέστερα φίλτρα, απιονισμένο νερό και μηχανήματα αιμοκάθαρσης με δικλίδες ασφαλείας. Παρόλα αυτά, οι περισσότερες μελέτες που έχουν διεξαχθεί έως τώρα δεν έδειξαν μια σαφή υπεροχή των νεότερων, περισσότερο βιοσυμβατών μεμβρανών, σε σύγκριση με τις παλαιότερες, λιγότερο βιοσυμβατές, όσον αφορά τις φλεγμονώδεις<sup>308</sup> και οξειδωτικές επιδράσεις τους στη διάρκεια της ΑΚΘ. Έτσι τα επίπεδα της CRP και των F<sub>2</sub> ισοπροστανίων δεν φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων σύγκρισης<sup>309</sup> και τα προϊόντα της οξειδωτικής τροποποίησης των πρωτεϊνών δεν φαίνεται να ελαττώνονται σημαντικά με τις νεότερες μεμβράνες<sup>310</sup>. Αυτό, όμως, που έχει παρατηρηθεί από αυτές τις μελέτες είναι ότι οι βιοσυμβατότερες μεμβράνες αιμοκάθαρσης βελτιώνουν το λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών, αφού η οξειδωτική τροποποίηση της αθηρογόνου LDL χοληστερόλης είναι σαφώς μικρότερη<sup>311;312</sup>. Επίσης, σημαντικός φαίνεται ότι είναι και ο ρόλος τους στη μείωση της αντίστασης στην ινσουλίνη με αποτέλεσμα, εκ νέου, να παρέχουν μεγαλύτερη καρδιαγγειακή προστασία<sup>309</sup>. Όσον αφορά το ρόλο της χρήσης διαλυμάτων αιμοκάθαρσης απαλλαγμένων από ενδοτοξίνες ή άλλες μολυσματικές ουσίες φαίνεται ότι είναι σημαντικός στην αποτροπή των μακροχρόνιων επιπλοκών της ΑΚΘ, όπως είναι η αμυλοείδωση και η αθηροσκλήρωση, καθώς τα επίπεδα της β<sub>2</sub>



μικροσφαιρίνης του πλάσματος, αλλά και η παραγωγή διαφόρων οξειδωτικών παραγόντων και μεσολαβητών φλεγμονής, μειώνονται<sup>313,314</sup>. Αλλά και η χρήση απιονισμένου νερού (μετά από ηλεκτρόλυση) στα διαλύματα αιμοκάθαρσης φαίνεται ότι συμμετέχει ενεργά στη βελτίωση των συνθηκών της μεθόδου. Τα διαλύματα αυτά έχουν τη δυνατότητα εκκαθάρισης των ROS διάμεσου της παραγωγής ατομικού υδρογόνου. Έτσι ο Huang και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η χρήση απιονισμένου νερού δρα σημαντικά στη μείωση του οξειδωτικού στρες, όπως προσδιορίζεται από τα επίπεδα της λιπιδιακής υπεροξειδωσης και της φλεγμονής, αλλά και της ευαισθησίας των ερυθροκυττάρων στην αιμόλυση στους αιμοκαθαρόμενους ασθενείς<sup>315</sup>.

Καθώς η τεχνική της ΑΚΘ, από μόνη της, αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες αύξησης του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής στους ασθενείς που υποβάλλονται σε αυτή, έχουν αναπτυχθεί δύο νέες τεχνικές που στοχεύουν ακριβώς στην αποτροπή αυτών των επιπλοκών: η αιμολιποδιάλυση και η ενσωμάτωση της βιταμίνη Ε στις κλασικές μεμβράνες αιμοκάθαρσης.

Η αιμολιποδιάλυση είναι μια τεχνική αιμοκάθαρσης στην οποία στο διάλυμα της αιμοκάθαρσης προστίθενται ασκορβικό οξύ και πολυακόρεστα λιποσώματα που περιέχουν βιταμίνη Ε. Τα λιποσώματα αυτά, αντιδρώντας με τα συστατικά του αίματος πάνω στις μεμβράνες αιμοκάθαρσης, τις οποίες όμως δεν διαπερνούν, απομακρύνουν υδρόφοβα συστατικά της κυκλοφορίας τα οποία δρουν ως μεσολαβητές φλεγμονής, όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF, platelet activating factor). Επίσης, διάμεσου της συνεργατικής δράσης της βιταμίνης Ε που περιέχουν με τη βιταμίνη C του διαλύματος, συμβάλλουν σημαντικά στη βελτίωση του οξειδωτικού περιβάλλοντος<sup>152,316,317</sup>. Η δεύτερη τεχνική αφορά, όπως αναφέρθηκε, την ενσωμάτωση της βιταμίνης Ε στις μεμβράνες αιμοκάθαρσης. Θεωρητικά, η τεχνική αυτή μπορεί να αυξήσει την αντιοξειδωτική προστασία βελτιώνοντας τη βιοσυμβατότητα των μεμβρανών. Συγκεκριμένα η βιταμίνη Ε δρα ως βασική αντιοξειδωτική ουσία κυρίως με τη διακοπή των καταρρακτών της λιπιδιακής υπεροξειδωσης. Αυτό το φαινόμενο έχει ιδιαίτερη σημασία για τη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, τα οποία γίνονται λιγότερο επιρρεπή στην αιμόλυση. Έτσι, η αναιμία βελτιώνεται και οι απαιτήσεις σε ερυθροποιητίνη μειώνονται<sup>318-320</sup>. Υπάρχουν, επίσης, μελέτες που έδειξαν ευνοϊκά αποτελέσματα για τη χρήση αυτών των μεμβρανών στη μείωση των παραγόντων του οξειδωτικού στρες<sup>321-325</sup> και στη μείωση της επιθηλιακής δυσλειτουργίας<sup>326,327</sup> και της ενεργοποίησης των κυτοκινών<sup>328</sup> σε αιμοκαθαρόμενους

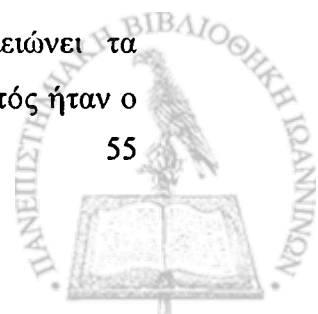


ασθενείς. Ωστόσο, καμία από αυτές τις μελέτες, έως τώρα, δεν έδειξε όφελος όσον αφορά τη βελτίωση της καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνητότητας.

Καθώς όμως αυτές οι τεχνικές είναι αρκετά πολύπλοκες, εδώ και αρκετά χρόνια διάφορες κλινικές μελέτες έχουν μελετήσει την αποτελεσματικότητα την από του στόματος χορήγηση βασικών αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως οι βιταμίνες C και E.

Όσον αφορά τη χορήγηση της βιταμίνης C, διάφορες μελέτες πραγματοποιήθηκαν με αντικρουόμενα, πολλές φορές, αποτελέσματα. Ο Fumegon και οι συνεργάτες του πρόσφατα έδειξαν ότι η από του στόματος χορήγηση ασκορβικού οξέος στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, για μικρό χρονικό διάστημα, δεν τροποποίησε κανένα από τους δείκτες φλεγμονής και οξειδωτικού στρες που χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες παρακολούθησης<sup>329</sup>. Εντούτοις, παλαιότερες μελέτες έδειξαν ότι η ενδοφλέβια χορήγηση βιταμίνης C έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της 8-υδρόξυ-2-δεοξυγουανωσίνη (8-OHdG) των λεμφοκυττάρων, το οποίο αποτελεί προϊόν οξειδωτικής τροποποίησης του DNA<sup>330</sup>, ενώ φαίνεται ότι βελτιώνει την αντίσταση στη δράση της ερυθροποιητίνης που παρατηρείται στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς με λειτουργική ανεπάρκεια σιδήρου, καθώς έχει την ικανότητα να κινητοποιεί το σίδηρο από τις αποθήκες του<sup>331;332</sup>. Πρέπει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι η χορήγηση της βιταμίνης C πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή, καθώς αυτή έχει τη δυνατότητα να δρα τόσο ως αντιοξειδωτικό όσο και ως ουσία που ευοδώνει την οξείδωση<sup>333;334</sup>. Έτσι, ιδιαίτερα σε ασθενείς που λαμβάνουν ενδοφλέβια σίδηρο, η χορήγηση μεγάλων δόσεων βιταμίνης C μπορεί να κινητοποιήσει αντιδράσεις τύπου Fenton, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των δραστικών ριζών υδροξυλίου με βλαβερές συνέπειες<sup>335</sup>. Τέλος, ένας από τους σημαντικότερους περιορισμούς χορήγησής της στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς είναι η αύξηση των επιπέδων του οξαλικού οξέος που προκαλεί<sup>336;337</sup>.

Η από του στόματος χορήγηση της βιταμίνης E φαίνεται ότι υπόσχεται περισσότερο όσον αφορά τη βελτίωση του οξειδωτικού περιβάλλοντος των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών. Αν και οι περισσότερες μελέτες, όπως ήδη έχει αναφερθεί, δεν έδειξαν σημαντικές μεταβολές των επιπέδων της βιταμίνης E στους ασθενείς αυτούς, η χορήγησή της φαίνεται ότι σχετίζεται με μείωση των προϊόντων της λιπιδιακής υπεροξειδωσης, αλλά και με βελτίωση της αναιμίας, πιθανά ως αποτέλεσμα της σταθεροποίησης των κυτταρικών μεμβρανών των ερυθροκυττάρων και αυξημένης αντίστασης στην αιμολυτική δράση οξειδωτικών παραγόντων<sup>249;338-344</sup>. Αυτό όμως που έχει ιδιαίτερη σημασία είναι εάν η βελτίωση αυτών των οξειδωτικών παραμέτρων έχει πιο μακροχρόνιες επιδράσεις, δηλαδή αν μειώνει τα καρδιαγγειακά συμβάματα και αν μειώνει τη θνητότητα αυτών των ασθενών. Αυτός ήταν ο



σκοπός της μελέτης SPACE (Secondary Prevention with Antioxidants of Cardiovascular Disease in End Stage Renal Disease), μιας τυχαιοποιημένης κλινικής μελέτης στην οποία συμμετείχαν 196 χρόνιοι αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς. Οι ασθενείς αυτοί τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες: σε αυτούς που ελάμβαναν 800 IU καθημερινά α τοκοφερόλης και σε αυτούς που ελάμβαναν εικονικό φάρμακο<sup>345</sup>. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση των εμφραγμάτων του μυοκαρδίου και άλλων καρδιαγγειακών συμβαμάτων στην ομάδα που έλαβε βιταμίνη Ε σε σύγκριση με τους ασθενείς που έλαβαν εικονικό φάρμακο. Παρόλο όμως αυτή την αξιοσημείωτη βελτίωση της καρδιαγγειακής νοσηρότητας, δεν υπήρξε καμιά διαφορά όσον αφορά τη συνολική επιβίωση των ασθενών των δύο ομάδων. Μια άλλη, πιο πρόσφατη, μελέτη, η μελέτη HOPE, που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια ΧΝΝ με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο, δεν έδειξε κανένα όφελος από τη χορήγηση βιταμίνης Ε όσον αφορά τα καρδιαγγειακά συμβάματα<sup>346</sup>. Τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν την ανάγκη περαιτέρω έρευνας και ανεύρεσης νέων θεραπευτικών στρατηγικών με σκοπό τη βελτίωση της συνολικής επιβίωσης.

Στην προσπάθεια αυτή χρησιμοποιήθηκε ένα άλλο, πλούσιο σε θειολικές ομάδες, αντιοξειδωτικό, η Ν-ακετυλκυστεΐνη. Έτσι, σχεδιάστηκε μια άλλη τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 134 αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς από τους οποίους οι μισοί πήραν Ν-ακετυλκυστεΐνη από το στόμα και οι υπόλοιποι εικονικό φάρμακο. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με τη μελέτη SPACE, ένα εύρημα που υποδηλώνει ότι παρόλο που παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων στην ομάδα που ελάμβανε την Ν-ακετυλκυστεΐνη, καμιά σημαντική διαφορά δεν υπήρχε στη συνολική επιβίωση μεταξύ των δύο ομάδων<sup>347</sup>. Οι ίδιοι ερευνητές μάλιστα, σε μια ξεχωριστή μελέτη, έδειξαν ότι η χορήγηση της Ν-ακετυλκυστεΐνης μειώνει τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης και βελτιώνει τη λειτουργία του ενδοθηλίου των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών<sup>348</sup>. Ανάλογα αποτελέσματα ανακοινώθηκαν και σε πιο πρόσφατες μελέτες<sup>349</sup>.

Τέλος, στους ασθενείς με ΧΝΝ και κυρίως στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς έχουν χρησιμοποιηθεί μια σειρά από διάφορες άλλες ουσίες που, έμμεσα, μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά, όπως το φυλλικό οξύ. Το φυλλικό οξύ φαίνεται ότι συμβάλλει στη μείωση της ομοκυστεΐναιμίας, ενός από τους «μη κλασικούς» παράγοντες κινδύνου για αθηροσκλήρωση<sup>350-355</sup>. Απαιτούνται όμως περαιτέρω προοπτικές μελέτες για να διευκρινιστεί ο ρόλος του στην καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα. Όσον αφορά το ρόλο της ερυθροποιητίνης, ήδη έχει αναφερθεί ότι ο αντιοξειδωτικός και αντιαποπρωτικός της ρόλος στην ουραιμία<sup>170;172-174;356;357</sup>



Πρέπει λοιπόν να αναφερθεί ότι η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες είναι άρρηκτα δεμένα μεταξύ τους, ενώ συμβάλλουν σημαντικά στην εγκατάσταση και την εξέλιξη της ΧΝΝ. Αλλά και η ίδια η νεφρική νόσος αποτελεί βασικό προδιαθεσικό παράγοντα παραγωγής ουσιών που ευοδώνουν τη φλεγμονή αλλά και οξειδωτικών παραγόντων, με αποτέλεσμα να δημιουργείται έτσι ένας φαύλος κύκλος που οδηγεί στην περαιτέρω επιδείνωση της νόσου. Ο προσδιορισμός αυξημένων επιπέδων διαφόρων οξειδωτικών παραγόντων, αλλά και των διαταραγμένων αντιοξειδωτικών μηχανισμών, όπως και η υψηλή επίπτωση καρδιαγγειακής νοσηρότητας στους ασθενείς αυτούς επιβεβαιώνουν τα όσα προαναφέρθηκαν. Απαιτούνται περαιτέρω μακροχρόνιες, τυχαιοποιημένες και πολυκεντρικές μελέτες για τα τη διευκρίνιση του, πιθανά, ωφέλιμου ρόλου στη ΧΝΝ, της χορήγησης διαφόρων αντιοξειδωτικών ουσιών.



## Δ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός των ασθενών με ΧΝΝ αλλά και οι σημαντικές μακροπρόθεσμες επιπλοκές της νόσου, με κυριότερη την καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα, έχουν καταστήσει επιτακτική την ανάγκη της πολυπαραγοντικής προσέγγισης και αντιμετώπισης της νόσου. Τα τελευταία χρόνια, μεταξύ των άλλων παραγόντων κινδύνου, αναγνωρίστηκε και ο σημαντικός ρόλος του οξειδωτικού στρες, τόσο στην εγκατάσταση και εξέλιξη της ΧΝΝ, όσο και στην εμφάνιση των επιπλοκών της. Οι περισσότερες μελέτες, έως τώρα, αφορούσαν ασθενείς που υποβάλλονταν ήδη σε μια από τις μεθόδους υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας και κυρίως σε ΑΚΘ. Λίγα δεδομένα, όμως, είναι γνωστά σχετικά με το πόσο νωρίς αρχίζει το οξειδωτικό στρες στην εξέλιξη της νόσου. Το γεγονός, μάλιστα, ότι υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι ο καρδιαγγειακός κίνδυνος στους ασθενείς αυτούς είναι αυξημένος από πολύ νωρίς στην εξέλιξη της νόσου, κάνει επιτακτική την ανάγκη πιο ενδεδειγμένης προσέγγισης αυτών των ασθενών. Σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν να προσδιοριστούν τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες τόσο στους ασθενείς με ΧΝΝ και διαφόρου βαθμού έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας, όσο και στους ασθενείς που υποβάλλονται σε εξωνεφρική κάθαρση, είτε με ΑΜΚ είτε με ΠΚ. Το ενδιαφέρον, επίσης, εστιάστηκε, στη σύγκριση των δύο μεθόδων υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, ΑΚΘ και ΠΚ, όσον αφορά τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες.

## Ε. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 5.1 Ασθενείς

Στη μελέτη μας συμμετείχαν 127 ασθενείς με ΧΝΝ που παρακολουθούνται στο Νεφρολογικό τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Από αυτούς τους ασθενείς οι 25 ήταν αιμοκαθαιρόμενοι, οι 21 υποβάλλονταν σε ΠΚ και οι 81 ήταν ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο σταδίων 2-4. Μια ομάδα επίσης από 20 υγιή άτομα με παρόμοια χαρακτηριστικά, όσον αφορά την ηλικία και το φύλο, συμμετείχαν ως ομάδα ελέγχου. Τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των υγιών ατόμων φαίνονται στον πίνακα 6.

	Υγιείς	ΑΚΘ	ΠΚ	Στάδια ΧΝΝ		
				4	3	2
Αριθμός ασθενών	20	25	21	27	29	25
Ηλικία (έτη)						
Μέση	60	65	59	61	63	59
Εύρος	29-78	26-80	18-77	30-81	29-77	35-79
Φύλο (Άνδρες/Γυναίκες)	12/8	16/9	13/8	14/13	18/11	15/10
Διάρκεια κάθαρσης (μήνες)*	-	48 ± 34	32 ± 23	-	-	-
Αλβουμίνη ορού (g/dl)*	4.20 ± 0.21	3.90 ± 0.5 <sup>§</sup>	3.64 ± 0.26 <sup>§</sup>	3.9 ± 0.43 <sup>§</sup>	4.13 ± 0.53	4.18 ± 0.35
CRP (mg/L)	3.10 ± 3.80	3.7 ± 5.2	3.6 ± 4.8	3.5 ± 3.8	3.7 ± 5.2	3.2 ± 4.2

\*Μέση τιμή ± SD

§ p<0.05 συγκριτικά με τους υγιείς

Η αιτιολογία της ΧΝΝ ήταν η διαβητική νεφροπάθεια σε 23 ασθενείς, η χρόνια σπειραματονεφρίτιδα σε 48 ασθενείς, η ισχαιμική νεφροπάθεια σε 13 ασθενείς, η χρόνια πυελονεφρίτιδα, οι πολυκυστικοί νεφροί και η αποφρακτική ουροπάθεια σε 18 ασθενείς, ενώ σε 25 ασθενείς η πρωτοπαθής νόσος ήταν άγνωστη (μικροί, ρικνοί νεφροί). Ανάμεσα στις διάφορες ομάδες ασθενών δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά την ηλικία, το φύλο, την αρτηριακή πίεση, αλλά και την αγωγή που ελάμβαναν (κυρίως όσον αφορά τους αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης, τους ανταγωνιστές των ΑΤΙ υποδοχέων της αγγειοτενσίνης, αλλά και τις στατίνες).

Οι αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς ήταν ενταγμένοι σε πρόγραμμα ΑΚΘ που περιλάμβανε 3 συνεδρίες την εβδομάδα για 240 λεπτά την κάθε συνεδρία. Νεότερες μεμβράνες (πολυσουλφόνη και πολυακρυλονιτρίλιο) χρησιμοποιήθηκαν στους 11 από τους 25 ασθενείς, ενώ στους υπόλοιπους ασθενείς χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες αιμοφάνης. Κατά τη διάρκεια της ΑΚΘ χρησιμοποιούνταν ένα συγκεκριμένο διάλυμα διττανθρακικών και ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους ως αντιπηκτικό.

Οι ασθενείς που ήταν ενταγμένοι σε ΠΚ υποβάλλονταν σε 4 αλλαγές ημερησίως με 2 λίτρα διαλυμάτων με συγκέντρωση γλυκόζης 1.86 ή 3.86%, ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε ασθενή για κάθαρση.

Η επάρκεια της κάθαρσης εκτιμήθηκε με το δείκτη Kt/V, ο οποίος και κυμαινόταν από 1.2 έως 1.4 για τους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς και από 1.9 έως 2.0 (εβδομαδιαίως) για τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΠΚ, τιμές που κυμαίνονται μέσα στα όρια που απαιτούνται ώστε η κάθαρση να θεωρείται επαρκής. Η υπολειμματική νεφρική λειτουργία (όπως αυτή εκτιμήθηκε από τον μέσο όρο της κάθαρσης κρεατινίνης των ασθενών) ήταν  $7\pm 4$  ml/λεπτό για τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΠΚ και  $<5.0$  για τους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς.

### **Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη**

Όλοι οι ασθενείς έπρεπε να βρίσκονται σε μια σταθερή κατάσταση για τουλάχιστον 6 μήνες πριν τη συλλογή του δείγματος. Αυτό σημαίνει ότι οι ασθενείς που για το χρονικό αυτό διάστημα εμφάνισαν περιτονίτιδες, φλεγμονές σε αρτηριοφλεβικές αναστομώσεις (fistulae) ή μοσχεύματα ή οποιαδήποτε άλλο είδος οξείας φλεγμονής αποκλείονταν από τη μελέτη. Ασθενείς, επίσης, με χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, αυτοάνοσα νοσήματα ή κακοήθειες δεν συμμετείχαν στη μελέτη. Τέλος όλοι οι ασθενείς δεν έπρεπε να λαμβάνουν βιταμινούχα



σκευάσματα και δεν έπρεπε να καπνίζουν. Και για τα υγιή άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη ίσχυαν τα ίδια κριτήρια αποκλεισμού.

## 5.2 Συλλογή των δειγμάτων

Στη μελέτη αυτή:

1. Χρησιμοποιήθηκε πλάσμα που απομονώθηκε μετά από φυγοκέντρηση από ολικό περιφερικό αίμα υγιών και ασθενών με ΧΝΝ, για την ανίχνευση των νιτροτυροσινών και των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, τα φλεβικά δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε σωλήνες που περιείχαν EDTA, τοποθετήθηκαν άμεσα σε πάγο και φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 1700 x g για 15 λεπτά. Τα υπερκείμενα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε δείγματα πλάσματος, διαχωρίστηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -80°C έως ότου χρησιμοποιήθηκαν.

Όσον αφορά τους αιμοκαθαρόμενους ασθενείς, φλεβικά δείγματα αίματος λαμβάνονταν άμεσα πριν την έναρξη της αιμοκάθαρσης μετά τη σύνδεση του ασθενή με το αρτηριακό σκέλος της συσκευής, ενώ για τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε περιτοναϊκή κάθαρση φλεβικό αίμα λαμβάνονταν χωρίς να γίνει διακοπή της μεθόδου κάθαρσης.

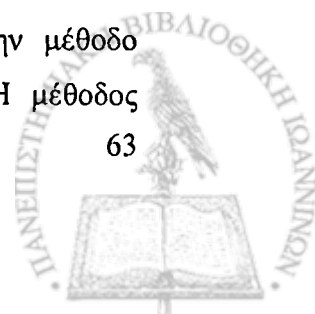
2. Χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα B- και T- λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από περιφερικό αίμα υγιών εθελοντών και αιμοκαθαρόμενων ασθενών και χρησιμοποιήθηκαν αμέσως για τον προσδιορισμό της βλάβης του DNA (όπως αναλυτικά περιγράφεται παρακάτω).

## 5.3 Προσδιορισμός βλάβης στις πρωτεΐνες: ανίχνευση νιτροτυροσινών και καρβονυλίων

Για τον προσδιορισμό των νιτροτυροσινών και των καρβονυλίων, ως δείκτες της οξειδωτικής τροποποίησης των πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του διαχωρισμού τους με ηλεκτροφόρηση, της μεταφοράς τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια της ανοσοαποτύπωσης με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων αντισωμάτων. Καθένα από τα στάδια αυτά αναφέρονται αναλυτικά στη συνέχεια.

### 5.3.1 Προσδιορισμός πρωτεΐνης

Η ολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών των δειγμάτων μετρήθηκε με την μέθοδο "protein microassay" της Bio-Rad, που βασίζεται στη μέθοδο Bradford<sup>358</sup>. Η μέθοδος



στηρίζεται στη μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης από τα 465 nm στα 595 nm όταν μια χρωστική, η Coomassie Brilliant Blue G-250, δεσμευτεί σε πρωτεΐνες κάτω από όξινες συνθήκες. Αναλυτικά η μέθοδος έχει ως εξής: Σε 800 μl από τα άγνωστα δείγματα πρωτεΐνης προστέθηκαν 200 μl του αντιδραστηρίου της Bio-Rad. Μετά από έντονη ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα άγνωστα δείγματα προσδιορίστηκε με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την οποία χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης από ορό βοός (BSA).

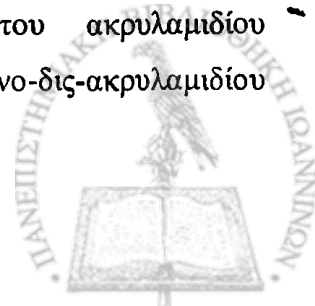
### **5.3.2 Προετοιμασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό των νιτροτυροσινών και των καρβονυλίων**

Για τον προσδιορισμό των νιτροτυροσινών χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πλάσματος που περιείχαν από 30μg ολικής πρωτεΐνης. Η αραίωση του πλάσματος για να επιτευχθεί η κατάλληλη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, έγινε με PBS (Phosphate buffered saline, pH 7.2-7.5).

Για τον προσδιορισμό των καρβονυλίων χρησιμοποιήθηκε το OxyBlot Kit (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA). Σύμφωνα, λοιπόν, με τις οδηγίες εφαρμογής του Kit αυτού, ποσότητα πλάσματος που περιείχε 15μg ολικής πρωτεΐνης τροποποιήθηκε σε δινιτροφαινυλδραζόνη (dinitrophenylhydrazone, DNP-hydrazone) μετά από αντίδραση με το αντιδραστήριο 2,4 δινιτροφαινυλδραζίνη (2,4 dinitrophenylhydrazine, DNPH). Ίδια ποσότητα πρωτεΐνης επώαστηκε με το διάλυμα μάρτυρος. Τόσο τα τροποποιημένα σε DNP-hydrazone πρωτεϊνικά δείγματα όσο και τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες ουδετεροποιήθηκαν με ένα διάλυμα που περιέχει γλυκερόλη και β-μερκαπτοαιθανόλη πριν να χρησιμοποιηθούν για ηλεκτροφόρηση. Τόσο στον προσδιορισμό των νιτροτυροσινών, όσο και των καρβονυλίων, χρησιμοποιήθηκαν διπλά δείγματα.

### **5.3.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή δωδεκυλοθειϊκού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου**

Οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν διαχωρίστηκαν στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου κάτω από συνθήκες αποδιάταξης της φυσικής δομής τους. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου είναι προϊόντα συνπολυμερισμού του ακρυλαμιδίου ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) και του N,N-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμιδίου



$(\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}=\text{CH}_2)$  και αποτελούν ηλεκτρικά ουδέτερα, υδρόφιλα, τρισδιάστατα πλέγματα που το μέγεθος των πόρων τους εξαρτάται από την ολική συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται διαμέσου της απελευθέρωσης ελευθέρων ριζών από το υπερθειικό αμμώνιο  $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8, \text{APS})$  με τη βοήθεια της  $\text{N,N,N',N'}$ -τετραμέθυλο-αιθυλοδιαμίνη (TEMED), η οποία καταλύει τη διάδοση των ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού. Ο αποδιατακτικός παράγοντας είναι το ανιονικό απορρυπαντικό δωδεκυλοθειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) και για αυτό το λόγο η ηλεκτροφόρηση χαρακτηρίζεται ως ηλεκτροφόρηση σε πηκτή δωδεκυλοθειικού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE).

Το σύστημα της πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο διαφορετικές πηκτές, την πηκτή διαχωρισμού (resolving gel ή running gel) και την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel). Η πηκτή επιστοιβάξης, στην οποία γίνεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του δείγματος πριν εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού, περιέχει 5% ακρυλαμίδιο (w/v), 0,125 M Tris pH=6,8 και 0,1 % (w/v) APS και SDS. Οι πρωτεΐνες εισέρχονται στη συνέχεια στην πηκτή διαχωρισμού που έχει την απαιτούμενη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Η πηκτή διαχωρισμού περιέχει 8, 10, 12 ή 15% ακρυλαμίδιο (w/v), 0,39 M Tris pH=8,8, 0,1% SDS και APS. Οι πρωτεΐνες για την ανίχνευση τόσο των νιτροτυροσινών όσο και των καρβονυλίων διαχωρίστηκαν σε πηκτή 10% SDS-ακρυλαμιδίου.

Όσον αφορά τον προσδιορισμό των νιτροτυροσινών, τα δείγματα των πρωτεϊνών μεταφέρθηκαν στο σύστημα της πηκτής, αφού πρώτα μετουσιώθηκαν με βρασμό επί 3 λεπτά στους  $100^\circ \text{C}$ , με το διάλυμα δείγματος. Το διάλυμα δείγματος (0,25 M Tris/HCl pH 6,8, 9,2% SDS, 40% (w/v) γλυκερόλη, 0,2% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης και 100 mM διθειοθρεϊτόλης (DTT)) αναμίχθηκε σε αναλογία 1:3 (v/v) με το πρωτεϊνικό δείγμα και ο βρασμός διευκόλυνε την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Το DTT ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες σε αναλογία περίπου 1,4 g SDS ανά gr πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα όλες οι πρωτεΐνες του δείγματος να εμφανίζουν περίπου το ίδιο αρνητικό φορτίο ανά μονάδα μάζας. Έτσι η ταχύτητα μετατόπισης της πρωτεΐνης στην πηκτή κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου εξαρτάται μόνο από το μοριακό της βάρος. Όσον αφορά τον προσδιορισμό των καρβονυλίων τα δείγματα δεν βράζονται αλλά πριν την μεταφορά τους στο σύστημα της πηκτής, προαιρετικά, αναμιγνύονται με το διάλυμα δείγματος σε αναλογία 3:1 (v/v) (το τελευταίο αυτό βήμα δεν είναι απαραίτητο γιατί η προηγηθείσα προσθήκη του διαλύματος ουδετεροποίησης κάνει τα δείγματα τόσο πυκνά ώστε να καταβυθίζονται στην πηκτή).



Εκτός από τα δείγματα τοποθετήθηκε στην πηκτή και μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. Οι πρωτεΐνες αυτές ήταν συνδεδεμένες με διαφορετικές χρωστικές και η παρουσία τους βοηθά στον προσδιορισμό των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών του πλάσματος που διαχωρίζονται.

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα που περιέχει 0,025 M Tris, 0,198 M γλυκίνη και 0,1 % SDS στα 150 Volts για περίπου 1 ώρα (συσκευή MINI – PROTEAN II , BIO-RAD).

Πρέπει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι σε κάθε πηκτή πολυακρυλαμιδίου τοποθετούνται δείγματα πλάσματος τόσο ασθενών όσο και υγιών ατόμων, ώστε οι συνθήκες της πειραματικής διαδικασίας να είναι οι ίδιες και για τις δύο ομάδες.

#### **5.3.4 Μεταφορά και αποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

##### ***Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης***

Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, η πηκτή και το διηθητικό χαρτί Whatman παρέμειναν για 5 λεπτά στο διάλυμα μεταφοράς που περιέχει 0.025 mM Tris, 0,190 M γλυκίνη και 20% μεθανόλη (Transfer buffer). Στη συνέχεια η μεμβράνη μεταφέρθηκε πάνω από την πηκτή και ακολούθως τα δύο μαζί τοποθετήθηκαν ανάμεσα από το χαρτί Whatman και όλα μαζί μεταφέρθηκαν σε συσκευή μεταφοράς (MINI TRANS – BLOT ELECTROPHORETIC TRANSFER CELL I, BIO – RAD) σχηματίζοντας ένα «σάντουιτς» με τη μεμβράνη να βρίσκεται προς το θετικό πόλο. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στο διάλυμα μεταφοράς στα 250 mAmp για 4 ώρες ή στα 60 mAmp για 16 ώρες. Το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,45 μm.

##### ***Αποτύπωση των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και δέσμευση αντισωμάτων (Western blotting)***

Μετά το τέλος της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η μεμβράνη ξεπλύθηκε μια φορά με PBS. Για να εξεταστεί εάν είχε λάβει χώρα σωστή μεταφορά από την πηκτή στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και αν ίσες ποσότητες δείγματος είχαν φορτωθεί στην πηκτή, έγινε χρώση των πρωτεϊνών με 0.2 % Ponceau S σε 1% οξικό οξύ για 30 δευτερόλεπτα. Η μεμβράνη ξεπλύθηκε με νερό για μερικά δευτερόλεπτα και



ελέγχθηκαν οι πρωτεΐνες που μεταφέρθηκαν. Στη συνέχεια η μεμβράνη αποχρωματίστηκε με PBS και ακολούθησε η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης.

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε υπό ανατάραξη με διάλυμα δέσμησης (blocking buffer). Το διάλυμα αυτό, όσον αφορά τον προσδιορισμό των νιτροτυροσινών, περιείχε 5 % άπαχο γάλα σε TBST (10 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl και 0,1% Tween-20), ενώ για τον προσδιορισμό των καρβονυλίων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα δέσμησης που περιείχε 1% BSA σε PBST (PBS που περιείχε 0.05% Tween-20), σύμφωνα με τις οδηγίες του Kit. Η επώαση με το διάλυμα αυτό δεσμεύει όλες τις ελεύθερες θέσεις πάνω στην νιτροκυτταρίνη. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε, επίσης υπό ανατάραξη, με ειδικό αντίσωμα έναντι νιτροτυροσινών ή καρβονυλίων σε κατάλληλη αραιώση και σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα ή ολονύκτια στους 4° C. Ακολούθησε επώαση με αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών συνδεδεμένο με υπεροξειδάση κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα:

Για την ανίχνευση των νιτροτυροσινών η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι νιτροτυροσινών (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), ενώ για τον προσδιορισμό των καρβονυλίων με αντίσωμα κουνελιού έναντι DNP (σύμφωνα με τις οδηγίες του Oxyblot Kit). Η μεμβράνη ξεπλύθηκε για 20 λεπτά με TBST και BSA/PBST αντίστοιχα, αλλάζοντας το διάλυμα έκπλυσης κάθε 5 λεπτά.

Μετά το πρώτο αντίσωμα ακολούθησε επώαση με αντίσωμα αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού (για την ανίχνευση των νιτροτυροσινών) και με αντίσωμα αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού (για την ανίχνευση των καρβονυλίων), συνδεδεμένα με υπεροξειδάση. Ακολούθως η μεμβράνη ξεπλύθηκε με τον ίδιο τρόπο που έγινε η έκπλυση του πρώτου αντισώματος.

### 5.3.5 Ανίχνευση πρωτεϊνών με την μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

Η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας στηρίζεται στην ανίχνευση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται κατά την αποδιέγερση ενός παραγώγου της λουμινόλης. Η λουμινόλη οξειδώνεται από την υπεροξειδάση παρουσία  $H_2O_2$  σε αλκαλικές συνθήκες σύμφωνα με την αντίδραση 8:





Αμέσως μετά την οξείδωση η λουμινόλη βρίσκεται στη διεγερμένη κατάσταση ενώ στη συνέχεια καταλήγει στη θεμελιώδη κατάσταση με εκπομπή φωτεινής ακτινοβολίας. Η εκπομπή της ακτινοβολίας ενισχύεται περίπου 1000 φορές και η διάρκειά της παρατείνεται όταν η αντίδραση γίνεται παρουσία χημικών ενισχυτών, όπως οι φαινόλες. Η μέγιστη ακτινοβολία, η οποία παρατηρείται 5-20 λεπτά μετά την αντίδραση, έχει μήκος κύματος 428 nm και ανιχνεύεται μετά από έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

Για την ανίχνευση του σήματος με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, η μεμβράνη μετά την επεξεργασία με τα αντισώματα επώαστηκε με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης (0,125 ml υποστρώματος/cm<sup>2</sup> μεμβράνης) για 1 λεπτό. Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετήθηκε ανάμεσα από διαφανή ζελατίνα και εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ για διάφορους χρόνους, από μερικά δευτερόλεπτα μέχρι και λίγα λεπτά, ώστε να ληφθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα. Μετά την έκθεση το φιλμ εμφανίστηκε με τοποθέτησή του επί 3 λεπτά στο διάλυμα εμφάνισης ενώ έγινε μονιμοποίηση του σήματος με τοποθέτησή του στο διάλυμα μονιμοποίησης για 7 λεπτά.

### 5.3.6 Χρώση των πρωτεϊνών στην πηκτή με Coomassie blue

Όπως ήδη έχει αναφερθεί κατά την προετοιμασία των δειγμάτων, τόσο για τον προσδιορισμό των νιτροτυροσινών, όσο και των καρβονυλίων, ετοιμάστηκαν διπλά δείγματα πλάσματος από κάθε ασθενή με την ίδια περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Το ένα από τα δείγματα αυτά ακολούθησε την διαδικασία η οποία προαναφέρθηκε για την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών που υφίστανται νίτρωση ή καρβονυλίωση, ενώ το άλλο δείγμα, μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, βάφτηκε με τη χρωστική Coomassie blue. Αναλυτικότερα, η πηκτή μεταφέρεται σε δοχείο με διάλυμα χρωστικής Coomassie (0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 9.2% (v/v) οξικό οξύ, 45.5% μεθανόλη) για 30 περίπου λεπτά υπό ανάδευση. Ο αποχρωματισμός γίνεται, υπό ολονύκτια ανάδευση, σε διάλυμα αποχρωματισμού (25% (v/v) μεθανόλη, 7%(v/v) οξικό οξύ) έτσι ώστε να απομακρυνθεί όλη η περίσσεια της χρωστικής. Με τη χρώση αυτή επιτυγχάνεται η αποτύπωση στην πηκτή όλων των πρωτεϊνών, όπως αυτές διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Έτσι φαίνεται ότι, αφενός μεν ο διαχωρισμός έχει γίνει με επιτυχία και ότι αφετέρου η ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό είναι η ίδια για όλα τα δείγματα.



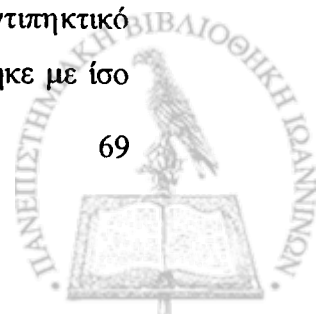
#### 5.4 Ανοσοκαθίζηση

Για την ανοσοκαθίζηση των νιτροτυροσινών ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Κάθε δείγμα πλάσματος, που περιείχε 500μg πρωτεΐνης διαλύθηκε σε 500 μl διαλύματος pH 7.4, που περιείχε 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10% γλυκερόλης, 1% Triton X-100, 4 mM EGTA, 1 mM PMSF, and 10 μg/ml απροτινίνης. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 4°C, σε συνεχή ανάδευση, σε όλη τη διάρκεια της νύχτας με 10μl αντισώματος έναντι νιτροτυροσινών (μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικίου IgG) το οποίο είναι συνδεδεμένο με αгарόζη (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Μετά από 2 λεπτά φυγοκέντρησης στις 10.000 rpm, απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα σφαιρίδια που καθιζάνουν ξεπλένονται 3 φορές με 500 μl φρέσκου διαλύματος. Μετά τα τελευταία ξέπλυμα η επανααιώρηση των σφαιριδίων έγινε σε 60 μl διαλύματος δείγματος που περιείχε 0.1mM DTT και τα δείγματα βράστηκαν για 5 λεπτά. Οι πρωτεΐνες που υπέστησαν ανοσοκαθίζηση στη συνέχεια διαχωρίστηκαν σε πηκτή 10% SDS-ακρυλαμιδίου και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (όπως ήδη έχει περιγραφεί). Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης με διάλυμα δέσμευσης που περιείχε 5% άπαχο γάλα σε TBST και στη συνέχεια η έκθεσή της σε διάφορα αντισώματα έναντι πρωτεϊνών που επιθυμούμε την ανίχνευσή τους. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα πολυκλωνικά έναντι σερουροπλασμίνης (αντίσωμα αιγός από την Sigma), τρανσφερίνης (αντίσωμα αιγός από την Sigma) και αλβουμίνης (αντίσωμα κουνελιού από την Abcam), ενώ ως δεύτερα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα αντισώματα συνδεδεμένα με υπεροξειδάση. Ακολούθησε ανίχνευση του σήματος με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

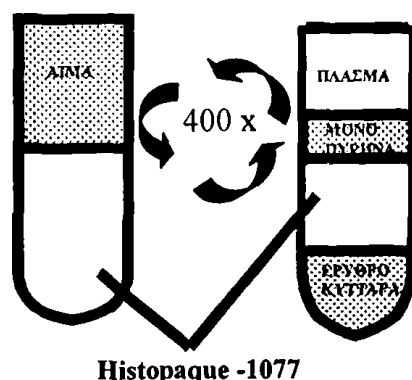
#### 5.5 Προσδιορισμός βλάβης στο DNA: Απομόνωση B και T λεμφοκυττάρων από περιφερικό αίμα και ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης (Single Cell Gel Electrophoresis SCGE ή comet assay)

##### *Απομόνωση B και T λεμφοκυττάρων από περιφερικό αίμα*

Για τον προσδιορισμό της βλάβης στο DNA απομονώθηκαν ανθρώπινα B- και T-λεμφοκύτταρα από ολικό περιφερικό αίμα, ακολουθώντας την εξής διαδικασία: αρχικά έγινε απομόνωση των μονοπύρηνων με τη βοήθεια ενός διαλύματος, του Histopaque-1077 από την SIGMA, με το οποίο επιτυγχάνεται γρήγορη ανάκτηση των ζωντανών μονοπύρηνων, από σχετικά μικρούς όγκους αίματος. Συγκεκριμένα, φλεβικό αίμα αναμίχθηκε με αντιπηκτικό διάλυμα 5 % EDTA σε 0.9 % NaCl, σε αναλογία 9:1, ενώ στη συνέχεια αραιώθηκε με ίσο



όγκο διαλύματος PBS. Το αίμα με το αντιπηκτικό, μεταφέρθηκε πάνω από τη στοιβάδα του Histopaque-1077 και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 450 x g για 10 λεπτά στους 18° C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης ο κυτταρικός πληθυσμός διαχωρίστηκε λόγω βαθμίδωσης πυκνότητας, όπως φαίνεται στο σχήμα 8. Τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα σχημάτισαν μια λεπτή στοιβάδα στη μεσόφαση πλάσματος-Histopaque-1077. Στην μεσόφαση περιέχονται, συνήθως σε αμελητέο ποσοστό, ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια, όπως και τα ουδετερόφιλα. Έτσι για την απομόνωση του μονοπυρηνικού πληθυσμού συλλέχθηκε με ιδιαίτερη προσοχή αυτή η μεσοφάση και ξεπλύθηκε δύο φορές με φυγοκέντρηση στις 250 x g, σε ψυχρό διάλυμα PBS στους 4° C, για 10 λεπτά, ώστε να ξεπλυθούν κυρίως τα ουδετερόφιλα που τυχόν ελήφθησαν με τη φάση αυτή. Ακολούθησε αναδιασπορά και καλλιέργεια του πληθυσμού των μονοπύρηνων, σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), εμπλουτισμένο με 10% απενεργοποιημένο με θέρμανση ορό από έμβρυο μόσχου και 4 mM L-γλουταμίνης. Στο θρεπτικό μέσο προστέθηκαν επίσης και 100 U/ml πενικιλίνης και 100 μg/ml στρεπτομυκίνης για την εξασφάλιση της στειρότητας. Ακολούθως μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer και τα κύτταρα προσαρμόστηκαν σε πυκνότητα  $1,5 \times 10^6$  κύτταρα / ml. Τα μονοπύρηννα ( $1,5 \times 10^6$  κύτταρα/ml) μεταφέρθηκαν σε πλαστικά πιάτα καλλιέργειας και επώαστηκαν για 1 ώρα σε επωαστικό θάλαμο στους 37° C και σε ατμόσφαιρα 95% αέρα και 5% CO<sub>2</sub>. Κατά τη διάρκεια αυτού του χρόνου τα μονοκύτταρα που υπήρχαν στον πληθυσμό αυτό κολλάνε στον πυθμένα, ενώ τα B- και T- λεμφοκύτταρα αιωρούνται στην καλλιέργεια. Η καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε καινούρια τρυβλία και έτσι η νέα καλλιέργεια περιείχε μόνο τα λεμφοκύτταρα. Μετά το διαχωρισμό του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού, η καλλιέργεια αφήνεται για 1 ακόμη ώρα στον επωαστικό θάλαμο, πριν ξεκινήσει το επόμενο στάδιο.



Σχήμα 8. Απομόνωση λεμφοκυττάρων από ανθρώπινο αίμα με τη βοήθεια του Histopaque

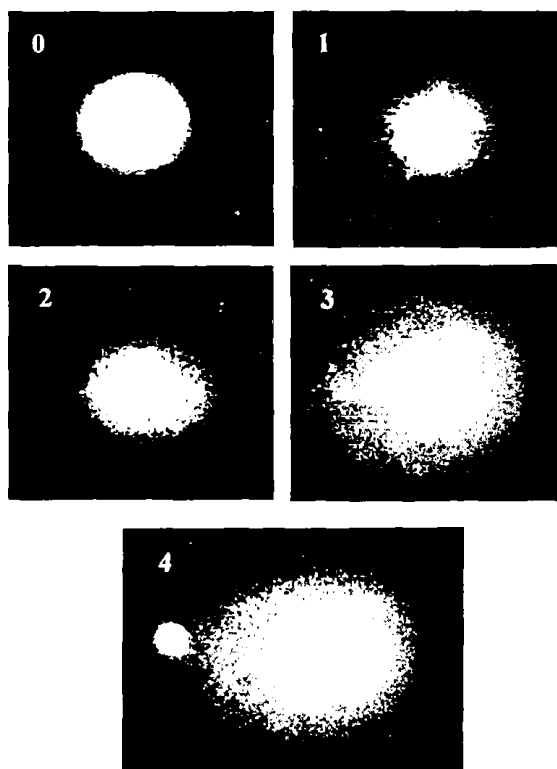
### *Ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης (Single Cell Gel Electrophoresis SCGE ή comet assay)*

Μετά την επώαση και το ξέπλυμα, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 100 μl διαλύματος αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης 1% σε PBS με pH 7.4 που έχει προεπωαστεί στους 37°C. Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρους πλάκες μικροσκοπίου που είχαν επιστρωθεί με 1% αγαρόζης φυσιολογικού σημείου τήξεως σε διάλυμα PBS και πάνω από αυτό τοποθετήθηκε μια καλυπτρίδα 2 x 2 cm. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες μεταφέρθηκαν στους 4° C, ώστε να πήξει η αγαρόζη και τα κύτταρα να παγιδευτούν μέσα στο στρώμα της πηκτής. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν για 1 ώρα σε ψυχρό διάλυμα λύσης που περιείχε 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris σε pH 10, 1% Triton X-100 v/v στους 4° C. Η λύση κάτω από αυτές τις συνθήκες απομακρύνει μεγάλο μέρος από τα κυτταρικά συστατικά, αλλά το DNA παραμένει υπερελκώμενο και πακεταρισμένο σε μια πυρηνοϊδή δομή (nucleus-like structure). Εν συνεχεία οι αντικειμενοφόρες πλάκες μεταφέρθηκαν σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης 30 εκατοστών που περιείχε ψυχρό αλκαλικό διάλυμα (0,3 M NaOH και 1 mM EDTA) για 40 λεπτά στους 4° C. Σε αυτό το ισχυρά αλκαλικό διάλυμα (pH>13) διαχωρίζονται οι δύο αλυσίδες του DNA (αλκαλικό ξεδίπλωμα). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στο ίδιο διάλυμα, στα 30 Volts και στα 300 mAmps για 30 λεπτά στους 4° C. Τέλος οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίστηκαν τρεις φορές από 5 λεπτά σε ψυχρό διάλυμα ουδετεροποίησης 0,4 M Tris pH 7,5.

Για την οπτική ανάλυση, πραγματοποιήθηκε χρώση του DNA με 35 μM Hoechst 33342 (Sigma) για 10 λεπτά και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού (Axiovert S 100, Zeitz) κάτω από φίλτρο UV και μεγέθυνση X 400. Όπως παρατηρήθηκε η βλάβη δεν ήταν ομοιόμορφη σε όλα τα κύτταρα. Έτσι τα κύτταρα ταξινομήθηκαν σε 5 τάξεις (0, 1, 2, 3 και 4) ανάλογα με την έκταση της βλάβης (εικόνα 3). Η τάξη 0 αντιστοιχεί στο ανέπαφο DNA που φαίνεται στρογγυλό και φωτεινό. Στην τάξη 1 αντιστοιχεί το DNA που περιέχει ένα μικρό ποσοστό βλάβης και εμφανίζεται στρογγυλό, αλλά πιο διάχυτο από τα νουκλεοτίδια της τάξης 0. Στις τάξεις 2, 3 και 4 η βλάβη στο DNA είναι πιο σημαντική και στην ηλεκτροφόρηση ένα μέρος του DNA μετακινείται προς την κάθοδο σχηματίζοντας «ουρά» Το ποσοστό του DNA που μετακινείται προς την κάθοδο είναι μικρότερο για την τάξη 2 και αυξάνει για την τάξη 3 και 4. Η οπτική μέτρηση της βλάβης στο κυτταρικό DNA του κάθε δείγματος βασίζεται στην τυχαία καταμέτρηση 100 τέτοιων σχηματισμών στην αντικειμενοφόρο πλάκα και στην κατάταξή τους σε μία από αυτές τις 5 τάξεις. Το % ποσοστό σε κάθε τάξη, πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό της τάξης, δηλαδή το ποσοστό των



σχηματισμών DNA στην τάξη 0 πολλαπλασιάζεται επί 0, το ποσοστό στην τάξη 1 πολλαπλασιάζεται επί 1 κλπ. Έτσι το ολικό άθροισμα από 100 σχηματισμούς κυμαίνεται από 0 (όταν το 100% αντιστοιχεί στην τάξη 0) έως 400 (όταν το 100 % των σχηματισμών αντιστοιχεί στην τάξη 4). Με αυτό τον τρόπο η ολική βλάβη στο DNA του κυτταρικού πληθυσμού μπορεί να εκφραστεί σε αυθαίρετες μονάδες. Κατά την καταμέτρηση η αντικειμενοφόρος πλάκα μετακινείται πάντα με τον ίδιο τρόπο.



Εικόνα 3. Σχηματισμοί του πυρηνικού DNA μετά από ανάλυση με την τεχνική comet assay

#### *Ανάλυση της μεθόδου*

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των βλαβών που προκαλούνται στο DNA ήταν η ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE), που είναι ευρέως γνωστή και ως comet assay. Η μέθοδος αυτή εκτιμά τις σχάσεις στις μονές αλυσίδες του κυτταρικού DNA. Πρόκειται για μια απλή,

γρήγορη και ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο φθορισμομετρικής μικροσκοπίας, με ένα ασυνήθιστο χαρακτηριστικό: η βλάβη στο DNA οπτικοποιείται σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Η ανάπτυξη της μεθόδου αποδίδεται προς τιμή στον Singh και τους συνεργάτες του<sup>359</sup> αν και πρώτοι οι Ostling και Johanson<sup>360</sup> το 1984 δημοσίευσαν μια παρόμοια μέθοδο για την ανίχνευση βλαβών στο DNA σε κύτταρα που εκτίθενται σε ιονίζουσα ακτινοβολία. Οι τροποποιήσεις στη μέθοδο που πρότειναν ο Singh και οι συνεργάτες του το 1988 αποτέλεσαν την βάση για τη μετέπειτα εξέλιξή της. Από την εμφάνισή της μέχρι σήμερα η μέθοδος έχει υποστεί επιπρόσθετες αλλαγές που αύξησαν σημαντικά την ευαισθησία και τη χρησιμότητα της μεθόδου. Έτσι, με διάφορες τροποποιήσεις είναι δυνατόν να ανιχνευθούν διαφορετικά είδη βλάβης, όπως είναι οι σχάσεις στις μονόκλωνες ή δίκλωνες αλυσίδες και η οξειδωση των βάσεων του DNA.

Με την παραλλαγή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη εκτιμούνται σχάσεις στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Επειδή δεν πρόκειται για θραύσματα στις διπλές αλυσίδες του DNA, για να ανιχνευθούν οι σχάσεις αυτές πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων κάτω από ισχυρά αλκαλικές συνθήκες ( $\text{pH} > 13$ ). Στις συνθήκες αυτές μετουσιώνεται το DNA (καταστρέφονται οι δεσμοί υδρογόνου και αποδιατάσσεται το δίκλωνο DNA προς σχηματισμό μονόκλωνων μορίων). Η παρουσία σχάσεων στις μονόκλωνες αλυσίδες επιτρέπει την μετατόπιση του DNA προς την άνοδο κατά την ηλεκτροφόρηση, με αποτέλεσμα να προκύπτουν σχηματισμοί του DNA που μοιάζουν με κομήτες, από το οποίο προκύπτει και το όνομα της τεχνικής. Μάλιστα, το ποσοστό του DNA που μετατοπίζεται είναι ανάλογο με τον αριθμό των σχάσεων στο DNA. Πριν την χρώση και την οπτική παρατήρηση οι δίκλωνες αλυσίδες του DNA, που δεν έχουν μετατοπιστεί κατά την ηλεκτροφόρηση, επανασχηματίζονται σε  $\text{pH} 7,5$ . Έτσι, οι σχηματισμοί που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο είναι στην πραγματικότητα «θηλιές» του DNA που απελευθερώνονται από ένα υψηλά υπερσυσπειρωμένο σύμπλοκο DNA-πρωτεϊνών (nucleoids).

## ΣΤ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δεδομένα παρουσιάζονται σαν μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση εκτός από τις μη παραμετρικές μεταβλητές οι οποίες παρουσιάζονται σαν διάμεση τιμή (εύρος). Οι συγκρίσεις ανάμεσα στις διάφορες ομάδες της μελέτης έγιναν με ανάλυση μεταβλητότητας (analysis of variance, ANOVA). Οι διαφορές στις μεταβλητές που αφορούσαν ποσοστά έγιναν με τη δοκιμασία  $\chi^2$ . Τέλος, οι διαφορές των μεταβλητών που μελετήθηκαν με τη χρήση φιλμ αξιολογήθηκαν με τη δοκιμασία ANCOVA (analysis of covariance) λαμβάνοντας υπόψη το φιλμ σαν συμμεταβλητή (covariance). Τιμές του  $p$  μικρότερες από 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

## Z. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 7.1 Προσδιορισμός οξειδωτικών τροποποιήσεων πρωτεϊνών

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν τα επίπεδα των νιτροτυροσινών και των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών του πλάσματος τόσο σε ασθενείς με ΧΝΝ σταδίων 2-4, όσο και σε ασθενείς που ήταν ενταγμένοι σε προγράμματα ΑΚΘ ή ΠΚ.

#### 7.1.1 Ανίχνευση νιτροτυροσινών

##### Ασθενείς σε ΑΚΘ

Μελετήθηκαν 25 ασθενείς που ήταν ενταγμένοι σε πρόγραμμα ΑΚΘ και 20 υγιή άτομα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Η εικόνα 4Α απεικονίζει ένα αντιπροσωπευτικό Western blot που περιλαμβάνει δείγματα τόσο αιμοκαθαίρομενων ασθενών (στήλες 1, 2, 3, 5 και 7) όσο και υγιών μαρτύρων (Υ) (στήλες 4, 6 και 8).

Παρατηρήσαμε, λοιπόν, ότι:

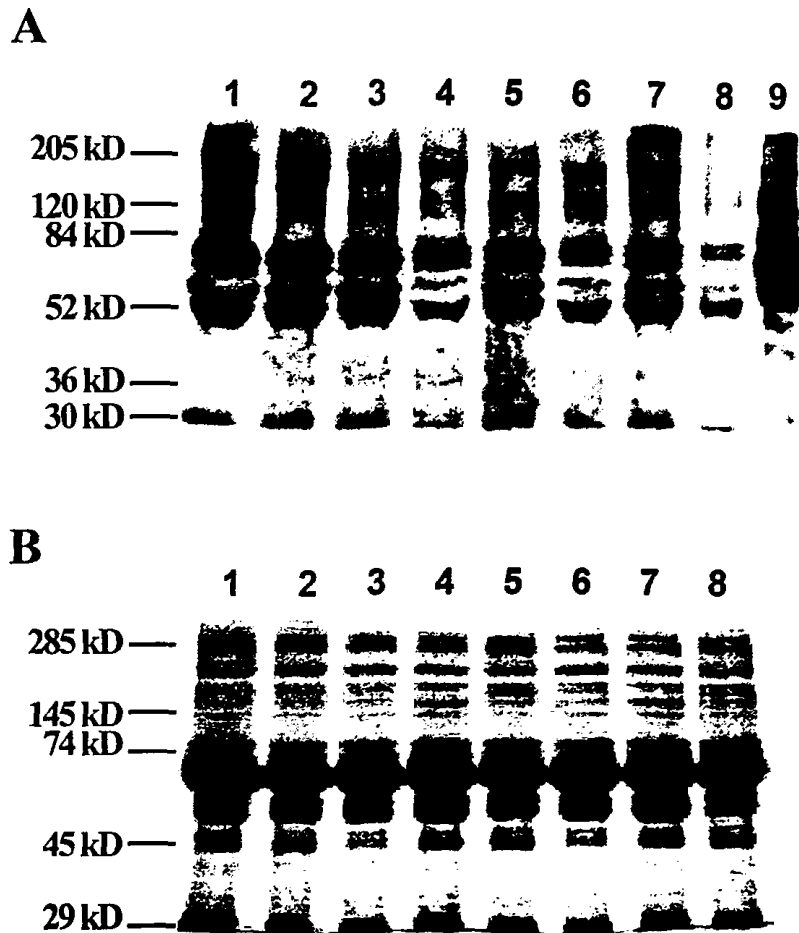
Α) Και στα υγιή άτομα έχουμε το σχηματισμό νιτροτυροσινών και μάλιστα σε διάφορες πρωτεΐνες με MB από 30 έως 300 kD.

Β) Σε όλους τους ασθενείς που εξετάστηκαν (αντιπροσωπευτικά η εικόνα απεικονίζει τους 5 από τους 25 ασθενείς που μελετήθηκαν) παρατηρήθηκε πολύ πιο έντονη δέσμευση αντισώματος σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, σχεδόν σε όλες τις πρωτεΐνες τους, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την παρουσία υψηλότερων επιπέδων νιτροτυροσινών στο πλάσμα τους.

Γ) Συγκρίνοντας, τέλος, το Western blot με μια απλή γέλη ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών του πλάσματος των ασθενών και των υγιών ατόμων (εικόνα 4Β), το οποίο έχει βαφτεί με Coomassie blue, όπως αναλυτικά περιγράφεται στο κεφάλαιο «κυλικά και μέθοδο», επιβεβαιώνεται ότι αφενός μεν το αντίσωμα είναι ειδικό, εφόσον δεσμεύεται σε μερικές μόνο από τις πρωτεΐνες και όχι σε όλες και αφετέρου ότι η ποσότητα των πρωτεϊνών που ηλεκτροφορήθηκε ήταν η ίδια και για τους ασθενείς και για τα υγιή άτομα και άρα τα αποτελέσματά μας δεν οφείλονταν σε χρησιμοποίηση διαφορετικής ποσότητας πρωτεΐνης στους ασθενείς από ότι στα υγιή άτομα.

Ως θετικό μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε πλάσμα υγιούς ατόμου που έχει υποστεί νίτρωση καθώς έχει εκτεθεί 1mM 3-morpholinopyridone (SIN-1) με αποτέλεσμα τη δημιουργία μίγματος  $\text{NO}\cdot$  και  $\text{O}_2\cdot^-$  (στήλη 9 στην εικόνα 4Α).





Εικόνα 4. Νίτρωση των πρωτεϊνών του πλάσματος των ασθενών σε ΑΚΘ

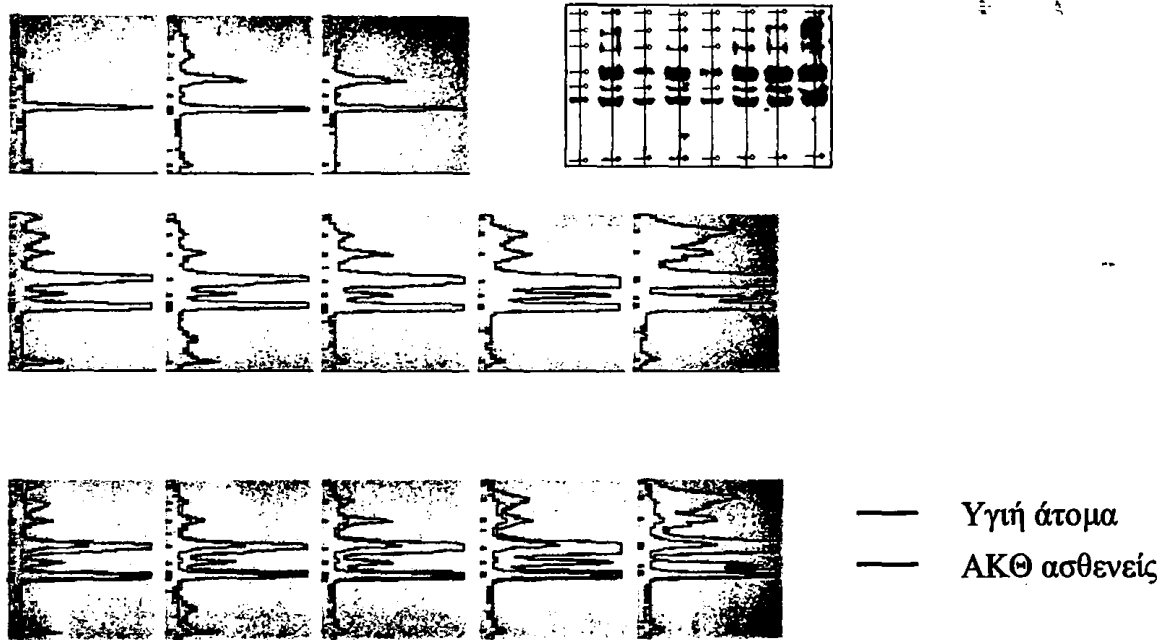
- (Α) Με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα νίτρωσης στους αιμοκαθαρόμενους ασθενείς (στήλες 1, 2, 3, 5 και 7), σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (στήλες 4, 6 και 8)
- (Β) Χρώση Coomassie blue σε γέλη πολυακρυλαμιδίου ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών του πλάσματος των ασθενών σε ΑΚΘ και των υγιών μαρτύρων Πλάσμα υγιούς ατόμου που έχει υποστεί νίτρωση με 1 mmol/L 3-morpholininosydnopimine χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας (στήλη 9)

Για να ελέγξουμε επιπρόσθετα την ειδικότητα του αντισώματος προεπώσαμε τα δείγματα με 20mM/L διθειονίδιο για 60 min με αποτέλεσμα την αναγωγή των νιτροτυροσινών σε αμινοτυροσίνες και την σχεδόν πλήρη εξαφάνιση του σήματος στο Western blot (εικόνα 5).



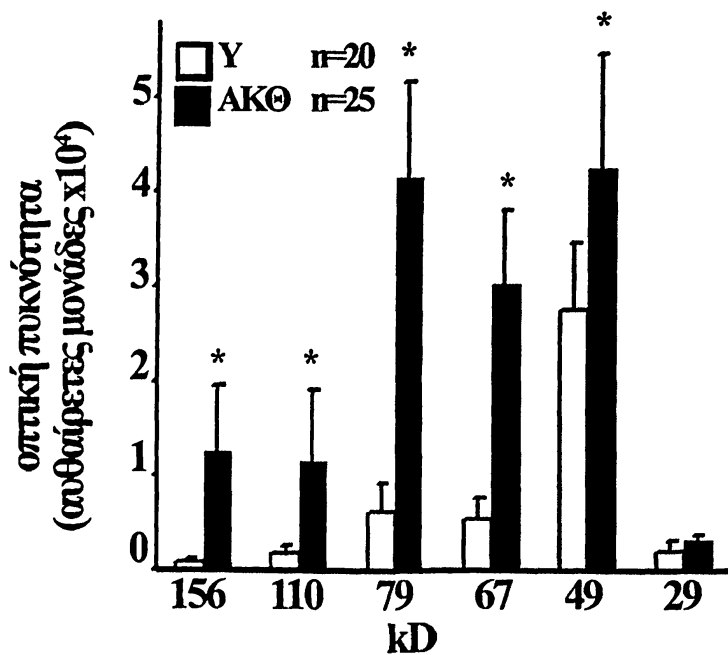
Εικόνα 5. Επίδραση της προεπώσης με διθειονίδιο στις νιτροτυροσίνες του πλάσματος των ασθενών σε AKΘ και των υγιών μαρτύρων (Υ). Σχεδόν πλήρη εξαφάνιση του σήματος

Χρησιμοποιώντας ένα ειδικό πρόγραμμα στον υπολογιστή, το 1D Image analysis software system (Kodak Digital Science), ανιχνεύτηκαν 6 τουλάχιστον διακριτές πρωτεΐνες που αντιστοιχούν περίπου στα MB των 156, 110, 79, 67, 49 και 29 kDa αντίστοιχα. Σε μερικές περιπτώσεις μάλιστα, παρόλο που το σύστημα ανιχνεύει μία μπάντα, είναι προφανές ότι αυτή αποτελείται από 2 ή περισσότερες αλληλοκαλυπτόμενες πρωτεΐνες. Στην εικόνα 6 διαγράφονται τα φάσματα των 3 υγιών ατόμων (με μπλε) και των 5 ασθενών σε AKΘ (με πράσινο). Είναι σαφής η διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στα υγιή άτομα και τους ασθενείς, ιδιαίτερα δε στα σχήματα που τα φάσματα επιπροβάλλονται.



Εικόνα 6. Φάσματα νίτρωσης των πρωτεϊνών του πλάσματος των ασθενών σε ΑΚΘ και των υγιών ατόμων, όπως αυτά δίνονται με τη χρήση του προγράμματος 1D Image analysis software system

Η επεξεργασία με ANOVA των προσδιορισμών της οπτικής πυκνότητας (όπως εκφράζεται η ένταση της κάθε μπάντας με το πρόγραμμα 1D Image analysis software system), επιβεβαιώνει τη στατιστικά σημαντική διαφορά που υπάρχει στην ανίχνευση των νιτροτυροσινών ανάμεσα στα υγιή άτομα και τους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς για όλες τις μπάντες πλην αυτής που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη των 29kD (εικόνα 7 και πίνακας 7).



Εικόνα 7. Στατιστική ανάλυση των επιπέδων των νιτροτυροσινών των ασθενών σε ΑΚΘ και των υγιών μαρτύρων (Y)

Αναλυτικότερα:

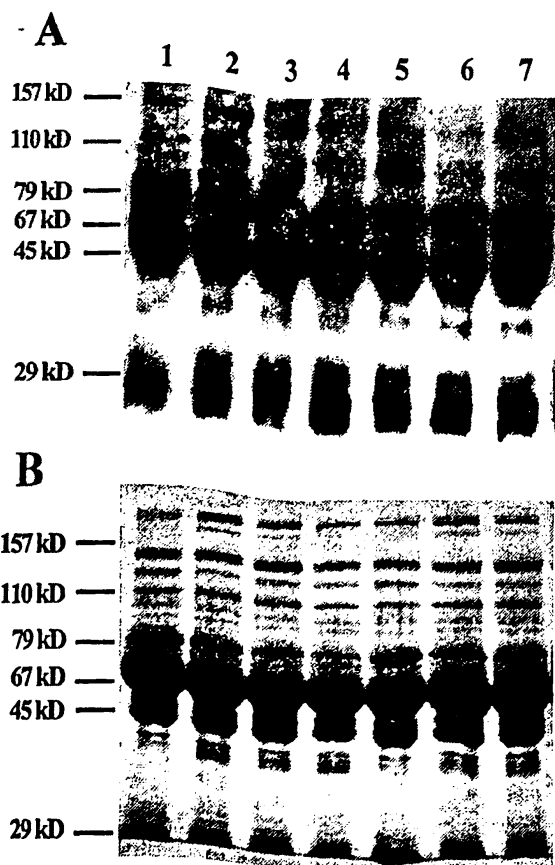
<b>Πίνακας 7. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού των νιτροτυροσινών σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς σε ΑΚΘ</b>			
	<b>Μέση τιμή έντασης μπάντας ± SD</b>		<b>P value (ANOVA)</b>
<b>kD</b>	<b>Υ</b>	<b>ΑΚΘ</b>	
<b>156</b>	671 ± 350	12505 ± 7101	<0.001
<b>110</b>	1800 ± 703	11507 ± 7503	<0.001
<b>79</b>	6226 ± 3021	41521 ± 10115	<0.001
<b>67</b>	5351 ± 2341	30143 ± 8132	<0.001
<b>49</b>	27554 ± 7041	42709 ± 12043	<0.001
<b>29</b>	2076 ± 1030	3066 ± 722	0.087

Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι δεν διαπιστώθηκε διαφορά στις μετρήσεις των νιτροτυροσινών ανάμεσα σε ασθενείς που βρίσκονταν σε ΑΚΘ με διαφορετικό τύπο μεμβράνης (κυτταρίνης και νεότερες, περισσότερο βιοσυμβατές), όπως επίσης και ανάμεσα σε ασθενείς με διαφορετικό υποκείμενο πρωτοπαθές νόσημα.

### **Ασθενείς σε ΠΚ**

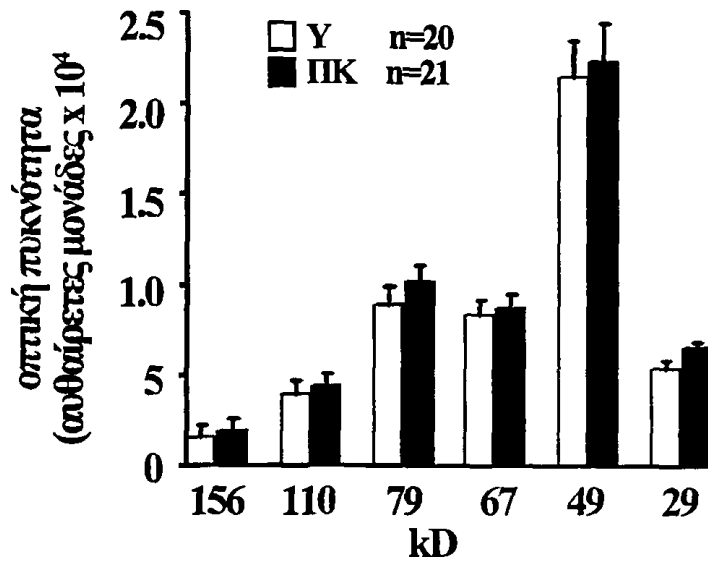
Το φαινόμενο της νίτρωσης των πρωτεϊνών μελετήθηκε επίσης και σε δείγματα πλάσματος 21 ασθενών που υποβάλλονταν σε ΠΚ (με τα χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο «υλικά και μέθοδο»). Το ίδιο έγινε και σε δείγματα πλάσματος που ελήφθησαν εκ νέου από τους 20 υγιείς μάρτυρες. Η εικόνα 8Α απεικονίζει ένα αντιπροσωπευτικό Western blot 4 ασθενών (στήλες 1, 3, 4 και 6) και 3 υγιών μαρτύρων (στήλες 2, 5 και 7). Φαίνεται, λοιπόν, ότι παρόλο που για όλες τις μπάντες που μελετήθηκαν η νίτρωση των πρωτεϊνών ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που υποβάλλονται σε ΠΚ συγκριτικά με τα υγιή άτομα, αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική για καμία από αυτές (εικόνα 9 και πίνακας 8).





Εικόνα 8. Νίτρωση των πρωτεϊνών του πλάσματος των ασθενών σε ΠΚ

- (A) Με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης δεν διαπιστώθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα νίτρωσης στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΠΚ (στήλες 1, 3, 4 και 6) σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (στήλες 2, 5 και 7)
- (B) Χρώση Coomassie blue σε γέλη πολυακρυλαμιδίου ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών του πλάσματος των ασθενών σε ΠΚ και των υγιών μαρτύρων

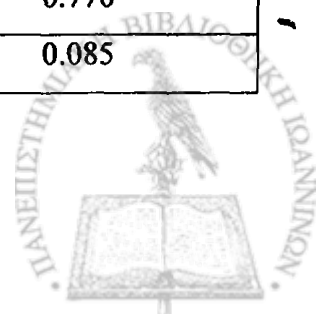


Εικόνα 9. Στατιστική ανάλυση των επιπέδων των νιτροτυροσινών των ασθενών σε ΠΚ και των υγιών μαρτύρων (Y)

Αναλυτικότερα:

**Πίνακας 8. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού των νιτροτυροσινών σε υγιή άτομα (Y) και σε ασθενείς σε ΠΚ**

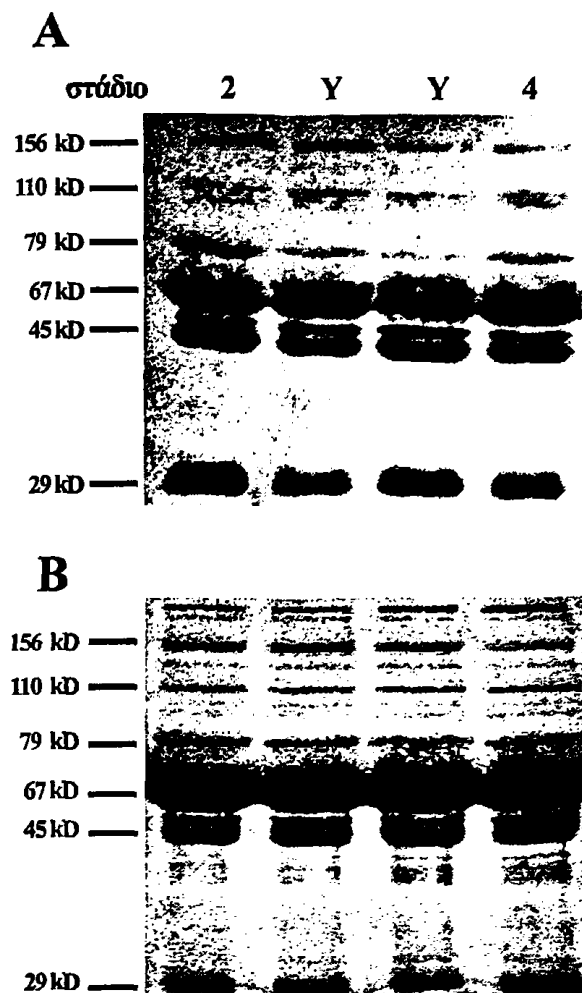
kD	Μέση τιμή έντασης μπάντας $\pm$ SD		P value (ANOVA)
	Y	ΠΚ	
156	1621 $\pm$ 682	1974 $\pm$ 663	0.864
110	3976 $\pm$ 750	4416 $\pm$ 656	0.664
79	8910 $\pm$ 1001	10146 $\pm$ 955	0.382
67	8378 $\pm$ 868	8752 $\pm$ 848	0.761
49	21481 $\pm$ 2084	22365 $\pm$ 2133	0.770
29	5452 $\pm$ 450	6609 $\pm$ 330	0.085



#### *Ασθενείς με ΧΝΝ σταδίων 2-4*

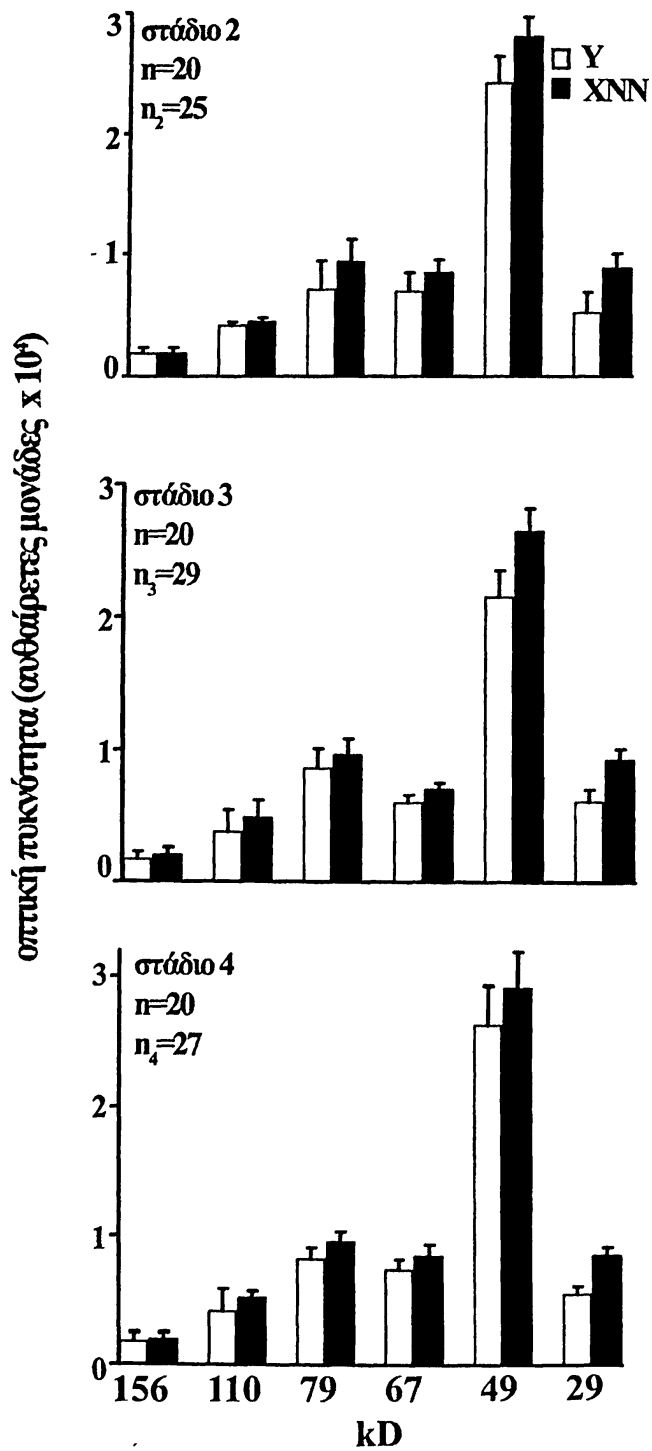
Δείγματα πλάσματος από 81 ασθενείς με ΧΝΝ σταδίων 2-4, και των 20 υγιών μαρτύρων χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των νιτροτυροσινών με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών αναφέρονται λεπτομερώς στο κεφάλαιο «υλικά και μέθοδοι». Στην εικόνα 10Α απεικονίζεται ένα αντιπροσωπευτικό Western blot 2 ασθενών (σταδίων 2 και 4) και 2 υγιών μαρτύρων (Υ). Με τη βοήθεια του προγράμματος 1D Image analysis software system προσδιορίστηκε η οπτική πυκνότητα για τις μπάντες που αντιστοιχούσαν σε πρωτεΐνες με MB 156, 110, 79, 67, 49 και 29 kD. Διαπιστώθηκε, λοιπόν, ότι παρόλο που ο προσδιορισμός της έντασης για όλες τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν ήταν μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, για καμία από αυτές και για κανένα στάδιο η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (εικόνα 11 και πίνακες 9, 10 και 11)





Εικόνα 10. Νίτρωση των πρωτεϊνών του πλάσματος ασθενών με XNN σταδίων 2-4

- (A) Με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης δεν διαπιστώθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα νίτρωσης μεταξύ ασθενών με XNN σταδίων 2 και 4 και υγιών μαρτύρων (Y)
- (B) Χρώση Coomassie blue σε γέλη πολυακρυλαμιδίου ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών του πλάσματος των ασθενών με XNN και των υγιών μαρτύρων



Εικόνα 11. Στατιστική ανάλυση των επιπέδων των νιτροτυροσινών των ασθενών με XNN σταδίων 2-4 και των υγιών μαρτύρων (Y)

Αναλυτικότερα:

**Πίνακας 9. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού των νιτροτυρισινών σε υγιή άτομα (Y) και σε ασθενείς με XNN σταδίου 2**

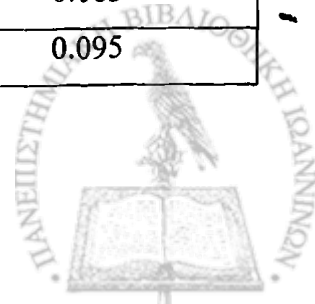
kD	Μέση τιμή έντασης μπάντας ± SD		P value (ANOVA)
	Y	XNN σταδίου 2	
156	1864 ± 515	1907 ± 460	0.680
110	4162 ± 288	4518 ± 273	0.750
79	7083 ± 2378	9337 ± 1929	0.346
67	6909 ± 1536	8483 ± 1073	0.523
49	24150 ± 2189	27981 ± 1608	0.425
29	5195 ± 1665	8785 ± 1215	0.082

**Πίνακας 10. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού των νιτροτυρισινών σε υγιή άτομα (Y) και σε ασθενείς με XNN σταδίου 3**

kD	Μέση τιμή έντασης μπάντας ± SD		P value (ANOVA)
	Y	XNN σταδίου 3	
156	1628 ± 647	2039 ± 518	0.710
110	3770 ± 1669	4849 ± 1346	0.625
79	8544 ± 1503	9598 ± 1257	0.599
67	6011 ± 593	7035 ± 481	0.197
49	21482 ± 2032	26403 ± 1729	0.077
29	6092 ± 890	9254 ± 844	0.073

**Πίνακας 11. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού των νιτροτυρισινών σε υγιή άτομα (Y) και σε ασθενείς με XNN σταδίου 4**

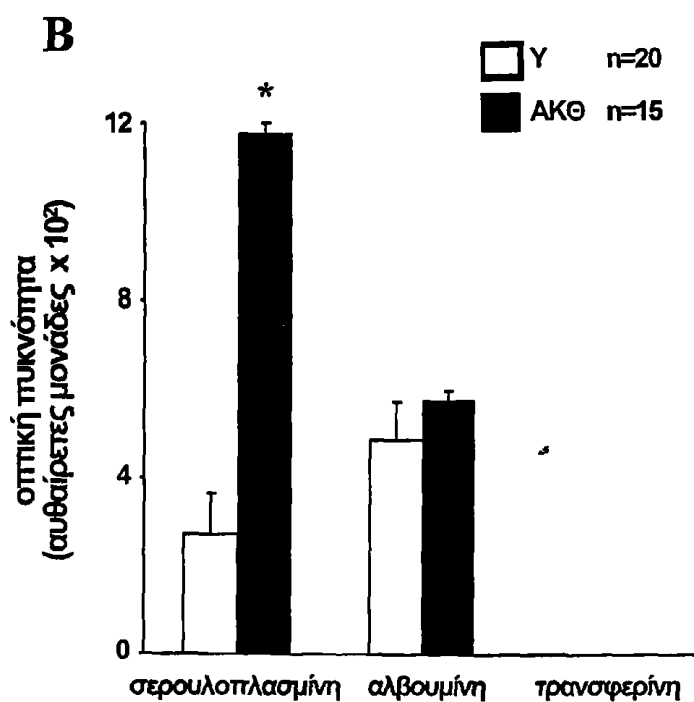
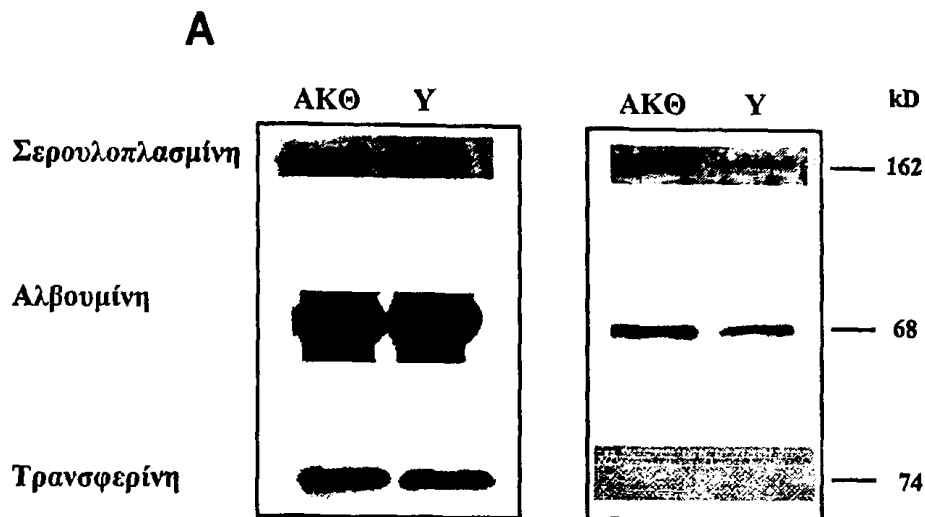
kD	Μέση τιμή έντασης μπάντας ± SD		P value (ANOVA)
	Y	XNN σταδίου 4	
156	1790 ± 665	1996 ± 492	0.820
110	4126 ± 1731	5129 ± 556	0.803
79	8229 ± 899	9529 ± 821	0.183
67	7380 ± 859	8465 ± 911	0.409
49	26418 ± 3011	29267 ± 2748	0.083
29	5493 ± 621	8567 ± 587	0.095



### 7.1.2 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών που υφίστανται νίτρωση σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς

Σε δείγματα πλάσματος των 15 από τους 25 αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανοσοκαθίζησης, όπως αυτή αναλυτικά περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι, για την απομόνωση των νιτροτυροσινών. Στη συνέχεια, με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων και τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, ανιχνεύτηκε η παρουσία της σερουλοπλασμίνης, της αλβουμίνης και της τρανσφερίνης σε αυτές. Η ίδια μέθοδος εφαρμόστηκε και για τους 10 από τους 20 υγιείς μάρτυρες. Παρατηρήθηκε ότι η σερουλοπλασμίνη είναι από τις πρωτεΐνες που όχι μόνο υφίστανται νίτρωση στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, αλλά και ότι η διαφορά του βαθμού της νίτρωσης, σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, είναι στατιστικά σημαντική. Η αλβουμίνη ανιχνεύτηκε ανάμεσα στις πρωτεΐνες που υφίστανται νίτρωση, χωρίς όμως ο βαθμός αυτής να διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τα υγιή άτομα. Όσον αφορά την τρανσφερίνη, δεν κατέστη δυνατό να ανιχνευτεί ανάμεσα στις νιτροτυροσίνες που απομονώσαμε με τη μέθοδο της ανοσοκαθίζησης, ούτε στα δείγματα των υγιών ατόμων ούτε και των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΑΚΘ (εικόνα 12 Α,Β). Αναλυτικότερα, η στατιστική ανάλυση έδειξε:

Πίνακας 12. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού της νίτρωσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς σε ΑΚΘ			
	Μέση τιμή έντασης μπάντας $\pm$ SD		P value (ANOVA)
Πρωτεΐνη	Υ	ΑΚΘ	
Σερουλοπλασμίνη	2735 $\pm$ 921	11798 $\pm$ 874	0.045
Αλβουμίνη	4872 $\pm$ 233	5773 $\pm$ 213	1.000
Τρανσφερίνη	0	0	



Εικόνα 12. Ταυτοποίηση των νιτροτυροσινών του πλάσματος των ασθενών σε ΑΚΘ και των υγιών μαρτύρων (Υ)

(Α) Η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευση της σερουλοπλασμίνης, της αλβουμίνης και της τρανσφερίνης χρησιμοποιήθηκε είτε άμεσα σε πλάσμα (αριστερά), είτε μετά την ανοσοκαθίζηση των νιτροτυροσινών (δεξιά)

(Β) Στατιστική ανάλυση των επιπέδων της νίτρωσης της σερουλοπλασμίνης, της αλβουμίνης και της τρανσφερίνης των ασθενών σε ΑΚΘ και των υγιών ατόμων (Υ)

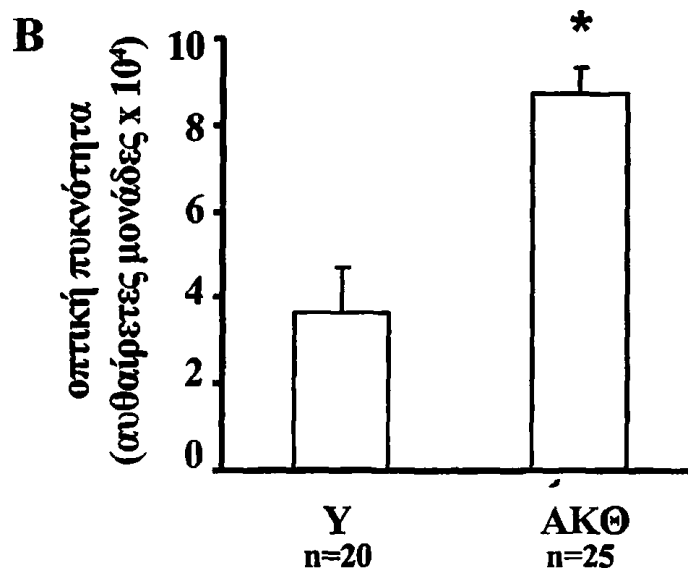
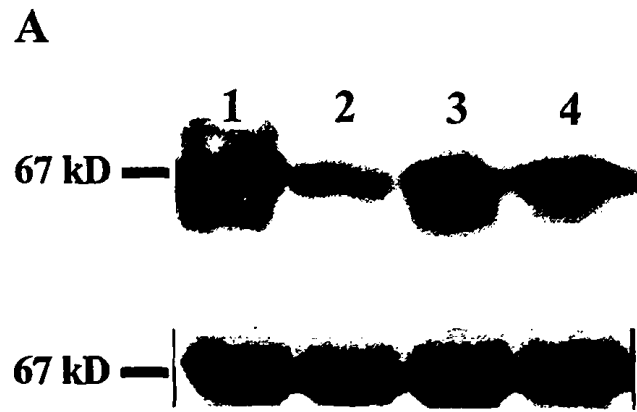
### 7.1.3 Ανίχνευση καρβονυλίων

#### Ασθενείς σε ΑΚΘ

Στα δείγματα πλάσματος των 25 αιμοκαθαιρόμενων ασθενών, στα οποία προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των νιτροτυροσινών, εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης εκ νέου για τον προσδιορισμό των επιπέδων της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα των 20 υγιών μαρτύρων. Χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο αντίσωμα έναντι DNP, όπως αναλυτικά περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι. Η εικόνα 13Α απεικονίζει ένα αντιπροσωπευτικό Western blot ανίχνευσης καρβονυλών σε 3 ασθενείς σε ΑΚΘ (στήλες 1, 3 και 4) και 1 υγιούς μάρτυρα (στήλη 2). Είναι λοιπόν προφανές ότι η αλβουμίνη είναι ιδιαίτερα καρβονυλιωμένη στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς και η διαφορά της καρβονυλίωσης από με τα υγιή άτομα είναι σαφώς στατιστικά σημαντική (εικόνα 13B και πίνακας 13).

Αναλυτικότερα:

Πίνακας 13. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης σε υγιή άτομα (Y) και σε ασθενείς σε ΑΚΘ			
	Μέση τιμή έντασης μπάντας $\pm$ SD		P value (ANOVA)
kD	Y	ΑΚΘ	
67	36500 $\pm$ 10647	87396 $\pm$ 6054	<0.001

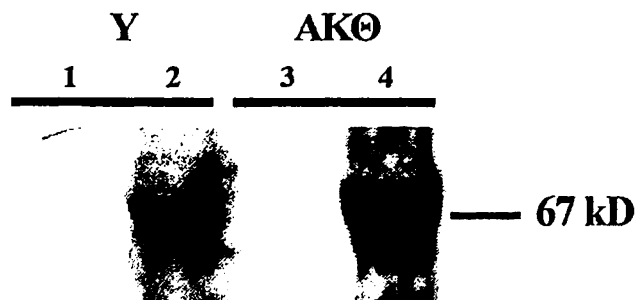


Εικόνα 13. Καρβονυλίωση της αλβουμίνης του πλάσματος των ασθενών σε ΑΚΘ

(Α) Με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα καρβονυλίωσης της αλβουμίνης μεταξύ ασθενών σε ΑΚΘ (στήλες 1, 3 και 4) και υγιών μαρτύρων (Υ) (στήλη 2) (πάνω). Χρώση Coomassie blue σε γέλη πολυακρυλαμιδίου ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών του πλάσματος των ασθενών σε ΑΚΘ και των υγιών μαρτύρων(κάτω)

(Β) Στατιστική ανάλυση των επιπέδων της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης των ασθενών σε ΑΚΘ και των υγιών μαρτύρων

Ελέγχθηκε, επίσης, η ειδικότητα του αντισώματος που δεσμεύει την καρβονυλιωμένη αλβουμίνη. Έτσι ανάλογη ποσότητα πρωτεϊνικού δείγματος από πλάσμα αιμοκαθαιρόμενων ασθενών και υγιών μαρτύρων αντέδρασε με το διάλυμα μάρτυρος. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 14, στις στήλες 1 και 3 που αντιστοιχούν τα δείγματα αυτά, δεν υπάρχει ανίχνευση σήματος, ούτε στο υγιές άτομα ούτε και στον ασθενή.

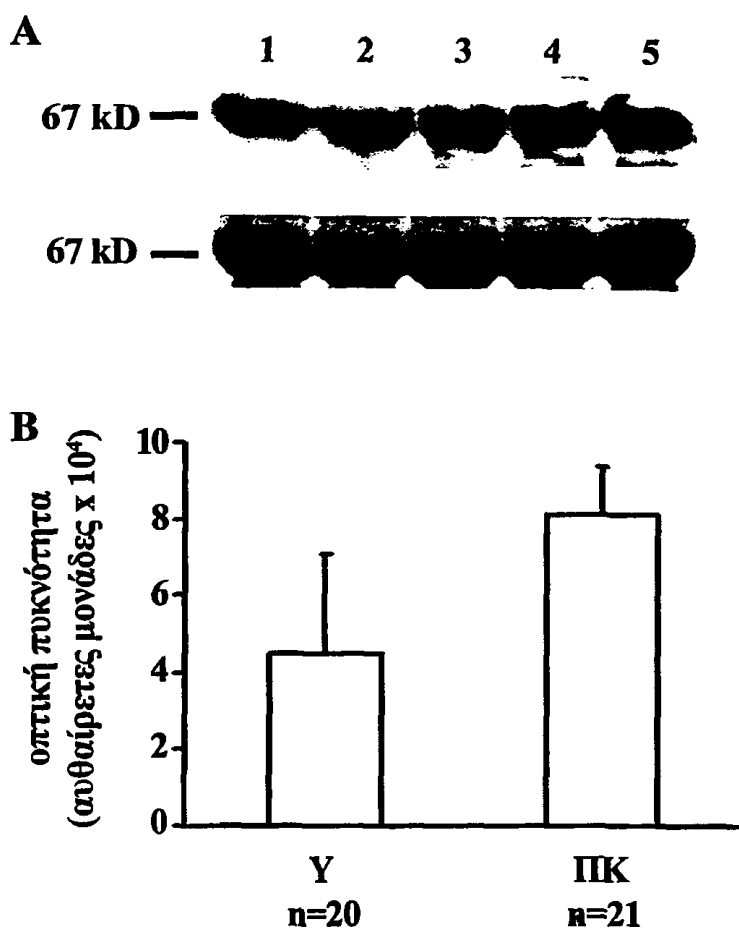


Εικόνα 14. Ανίχνευση της ειδικότητας του αντισώματος δέσμευσης των καρβονυλίων μετά από προεπάση του πλάσματος των ασθενών σε ΑΚΘ και των υγιών ατόμων (Υ) με διάλυμα μάρτυρος. Δεν υπάρχει ανίχνευση σήματος

#### Ασθενείς σε ΠΚ

Όταν τα δείγματα των 21 ασθενών που υποβάλλονταν σε ΠΚ εξετάστηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης για τα επίπεδα της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης βρέθηκε ότι ναι μεν τα επίπεδα αυτά ήταν υψηλότερα συγκριτικά με τα υγιή άτομα, ωστόσο η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (εικόνα 15B και πίνακας 14). Στην εικόνα 15A φαίνεται ένα αντιπροσωπευτικό Western blot από 3 ασθενείς που υποβάλλονται σε ΠΚ (στήλες 3, 4 και 5) και 2 υγιείς μάρτυρες (στήλες 1 και 2).





Εικόνα 15. Καρβονυλίωση της αλβουμίνης του πλάσματος των ασθενών σε ΠΚ

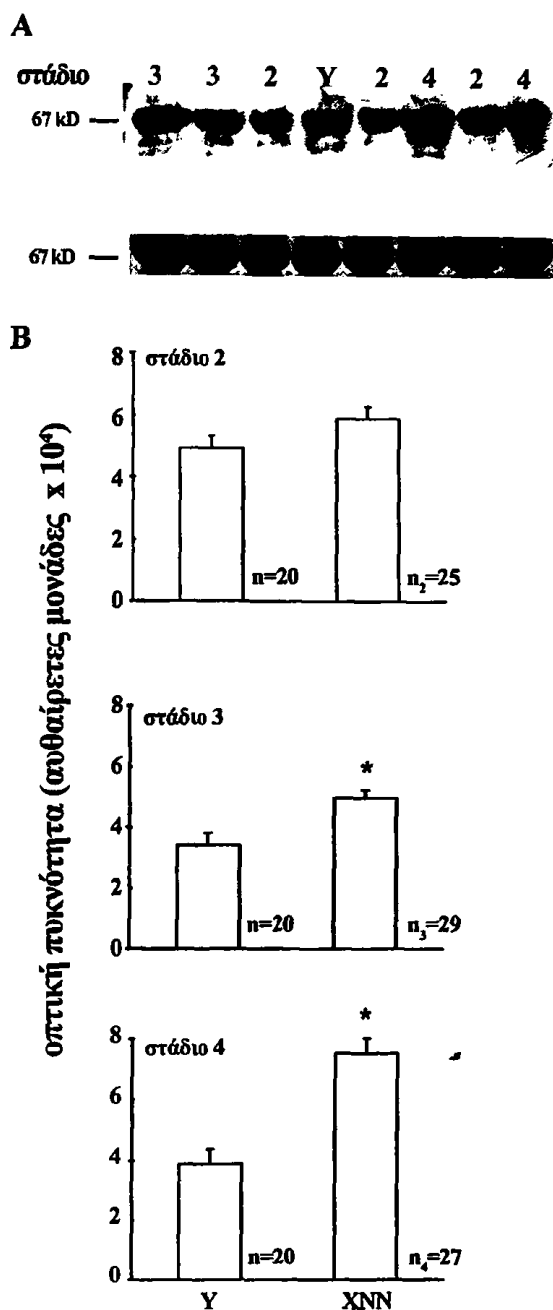
- (A) Με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης δεν διαπιστώθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα καρβονυλίωσης της αλβουμίνης μεταξύ ασθενών σε ΠΚ (στήλες 3, 4 και 5) και υγιών μαρτύρων (Υ) (στήλες 1 και 2) (πάνω). Χρώση Coomassie blue σε γέλη πολυακρυλαμιδίου ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών του πλάσματος των ασθενών σε ΠΚ και των υγιών μαρτύρων (κάτω)
- (B) Στατιστική ανάλυση των επιπέδων της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης των ασθενών σε ΠΚ και των υγιών μαρτύρων (Υ)

Αναλυτικότερα:

Πίνακας 14. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού της καρβουλιωμένης αλβουμίνης σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς σε ΠΚ			
kD	Μέση τιμή έντασης μπάντας $\pm$ SD		P value (ANOVA)
	Υ	ΠΚ	
67	45028 $\pm$ 26188	81556 $\pm$ 12388	0.224

#### Ασθενείς με ΧΝΝ σταδίων 2-4

Στο πλάσμα των 81 ασθενών με ΧΝΝ σταδίων 2, 3 και 4 εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης για τον προσδιορισμό των καρβουλιωμένης αλβουμίνης και εκτιμήθηκε σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής στους 20 υγιείς μάρτυρες. Η εικόνα 16Α περιγράφει ένα αντιπροσωπευτικό Western blot. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι η καρβουλίωση της αλβουμίνης σε ασθενείς με ΧΝΝ σταδίου 2 ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα των υγιών μαρτύρων, αλλά αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντιθέτως οι ασθενείς με ΧΝΝ σταδίων 3 και 4 είχαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα καρβουλιωμένης αλβουμίνης σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (εικόνα 16B και πίνακες 15, 16 και 17).



Εικόνα 16. Καρβονυλίωση της αλβουμίνης του πλάσματος των ασθενών με ΧΝΝ σταδίων 2-4

(Α) Με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης διαπιστώθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα καρβονυλίωσης της αλβουμίνης μεταξύ ασθενών με ΧΝΝ σταδίων 3 και 4 και υγιών μαρτύρων (Y), όχι όμως και μεταξύ ασθενών σταδίου 2 και υγιών μαρτύρων (πάνω). Χρώση Coomassie blue σε γέλη πολυακρυλαμίδιου ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών του πλάσματος των ασθενών με ΧΝΝ και των υγιών μαρτύρων (κάτω).

(Β) Στατιστική ανάλυση των επιπέδων της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης των ασθενών με ΧΝΝ σταδίων 2-4 και των υγιών μαρτύρων (Y)

Αναλυτικότερα:

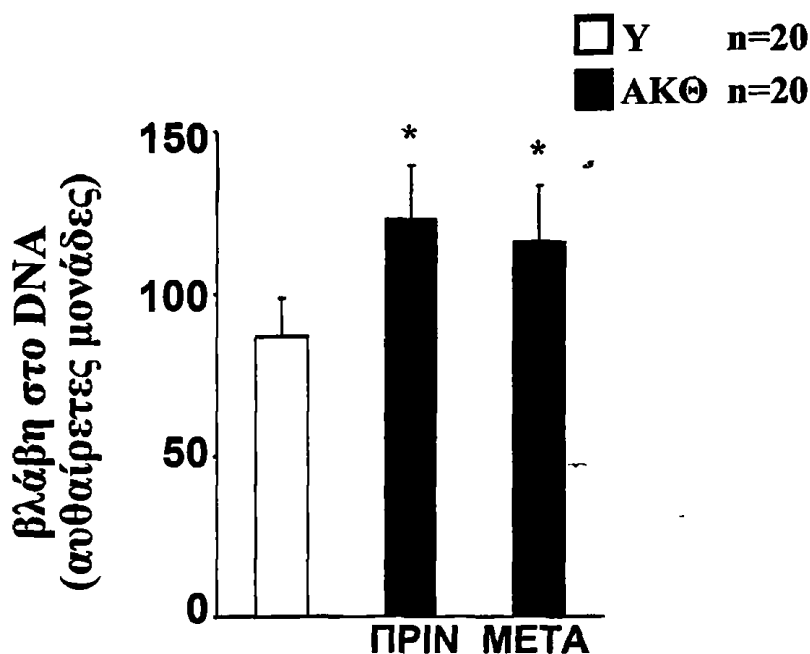
Πίνακας 15. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης σε υγιή άτομα (Y) και σε ασθενείς με XNN σταδίου 2			
	Μέση τιμή έντασης μπάντας ± SD		P value (ANOVA)
kD	Y	XNN σταδίου 2	
67	49256 ± 4019	58879 ± 3865	0.128

Πίνακας 16. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης σε υγιή άτομα (Y) και σε ασθενείς με XNN σταδίου 3			
	Μέση τιμή έντασης μπάντας ± SD		P value (ANOVA)
kD	Y	XNN σταδίου 3	
67	34162 ± 3941	49481 ± 2803	<0.01

Πίνακας 17. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης σε υγιή άτομα (Y) και σε ασθενείς με XNN σταδίου 4			
	Μέση τιμή έντασης μπάντας ± SD		P value (ANOVA)
kD	Y	XNN σταδίου 4	
67	40236 ± 6338	73338 ± 5997	<0.01

## 7.2 Προσδιορισμός βλαβών στο DNA των λεμφοκυττάρων των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών

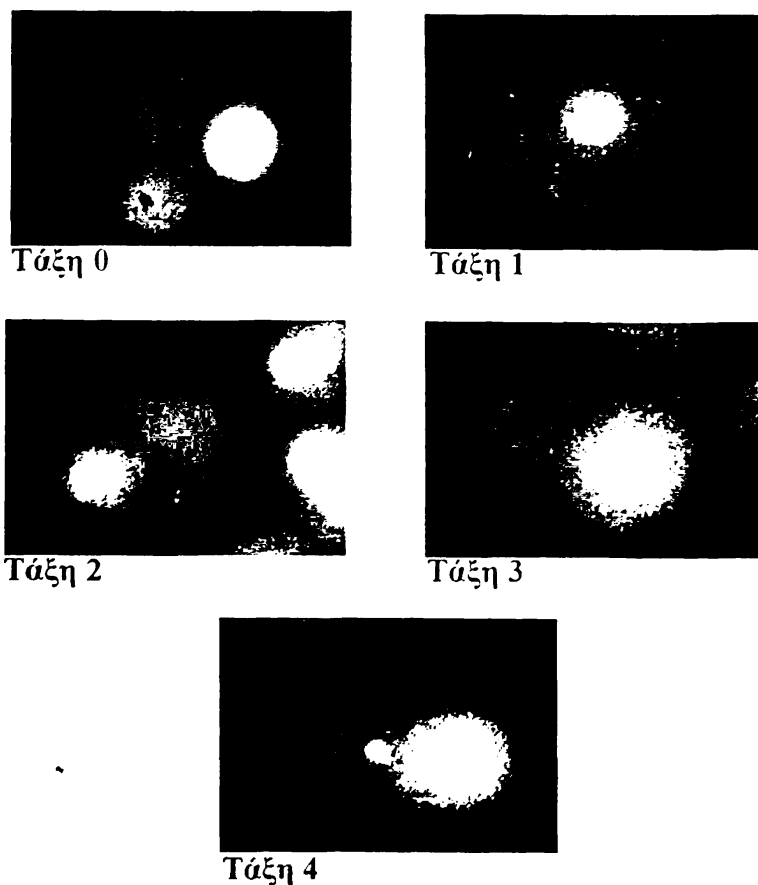
Εξετάσαμε την κατάσταση του DNA των λεμφοκυττάρων των 20 αιμοκαθαιρόμενων ασθενών και των 20 υγιών μαρτύρων με τη μέθοδο comet assay, όπως αυτή αναλυτικά περιγράφηκε στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι. Έτσι, αφού απομονώσαμε Β- και Τ-Λεμφοκύτταρα από ολικό περιφερικό αίμα αιμοκαθαιρόμενων ασθενών, ακολουθήσαμε την προαναφερόμενη πειραματική διαδικασία. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι οι σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA των λεμφοκυττάρων των ασθενών αυτών είναι σημαντικά αυξημένες συγκριτικά με τα υγιή άτομα. Επίσης, μια άλλη παρατήρηση ήταν ότι το DNA των λεμφοκυττάρων των ασθενών μετά την ΑΚΘ έχει μικρότερο ποσοστό βλάβης σε σχέση με το DNA πριν την ΑΚΘ, αλλά η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική (εικόνα 17 και πίνακας 18).



Εικόνα 17. Προσδιορισμός της βλάβης του DNA των λεμφοκυττάρων των ασθενών σε ΑΚΘ και των υγιών μαρτύρων (Υ) με τη μέθοδο comet assay

Πίνακας 18. Στατιστική ανάλυση του προσδιορισμού της βλάβης του DNA των λεμφοκυττάρων σε υγιή άτομα (Υ) και σε ασθενείς σε ΑΚΘ		
Βλάβη στο DNA $\pm$ SD		P value (ANOVA)
Υ	87 $\pm$ 12	] <0.01      ] <0.01      ] = 0.15
πριν ΑΚΘ	123 $\pm$ 16.9	
μετά ΑΚΘ	116 $\pm$ 17.3	

Ενδεικτικά φαίνονται μερικοί από τους κομήτες που φωτογραφήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού (ενδεικτικοί βλάβης του DNA) (εικόνα 18).



Εικόνα 18. Σχηματισμοί του πυρηνικού DNA των λεμφοκυττάρων των ασθενών σε ΑΚΘ μετά από ανάλυση με την τεχνική comet assay

## Η. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός των ασθενών με ΧΝΝ<sup>1</sup> αλλά και οι σημαντικές μακροπρόθεσμες επιπλοκές της νόσου, με κυριότερη την καρδιαγγειακή νοσηρότητα<sup>126;127;252-254</sup>, έχουν καταστήσει επιτακτική την ανάγκη της πολυπαραγοντικής προσέγγισης και αντιμετώπισης της νόσου. Τα τελευταία χρόνια, μεταξύ των άλλων παραγόντων κινδύνου, αναγνωρίστηκε και ο σημαντικός ρόλος του οξειδωτικού στρες, τόσο στην εγκατάσταση και εξέλιξη της ΧΝΝ, όσο και στην εμφάνιση των επιπλοκών της<sup>132-134</sup>. Έτσι, πολλοί είναι εκείνοι οι ερευνητές που κατά καιρούς ασχολήθηκαν με τον προσδιορισμό διαφόρων οξειδωτικών παραγόντων σε χρόνιους νεφροπαθείς, όπως και με την επίδραση της χορήγησης αντιοξειδωτικών ουσιών σε αυτούς. Οι περισσότερες, όμως, από τις μελέτες αυτές αφορούσαν ασθενείς που υποβάλλονταν ήδη σε μια από τις μεθόδους υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας και κυρίως σε ΑΚΘ. Η ΑΚΘ αποτελεί ένα πολύ καλό μοντέλο μελέτης του οξειδωτικού στρες, καθώς είναι πολλοί εκείνοι οι παράγοντες που συμβάλλουν τόσο στην αύξηση των οξειδωτικών παραγόντων, με κυριότερο την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων μετά την επαφή τους με τις μεμβράνες της ΑΚΘ, όσο και στην μείωση των αντιοξειδωτικών ουσιών<sup>146;147;149;150</sup>.

Λίγα δεδομένα, όμως, είναι γνωστά σχετικά με το πόσο νωρίς αρχίζει το οξειδωτικό στρες στην εξέλιξη της νόσου. Το γεγονός, μάλιστα, ότι υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι ο καρδιαγγειακός κίνδυνος στους ασθενείς αυτούς είναι αυξημένος από πολύ νωρίς στην εξέλιξη της νόσου κάνει επιτακτική την ανάγκη πιο ενδελεχούς προσέγγισης αυτών των ασθενών<sup>361-364</sup>. Επίσης είναι λίγες οι μελέτες που συγκρίνουν την συμβολή της κάθε μιας από τις μεθόδους εξωνεφρικής κάθαρσης στα αυξημένα επίπεδα του οξειδωτικού στρες.

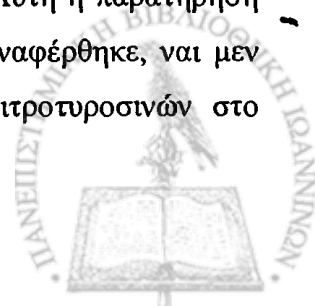
Έτσι τα βασικά ερωτήματα που τίθενται είναι:

- 1) η ουραιμία, από μόνη της, συμβάλλει στην διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας;
- 2) ΑΚΘ ή ΠΚ; Υπάρχουν διαφορές στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες μεταξύ των δύο μεθόδων υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας;

Σε αυτά τα βασικά ερωτήματα προσπαθήσαμε να δώσουμε απαντήσεις με την παρούσα μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε τόσο σε ασθενείς με ΧΝΝ και διαφόρου βαθμού έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας, όσο και σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε εξωνεφρική κάθαρση είτε με ΑΜΚ είτε με ΠΚ.

Οι οξειδωτικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών και συγκεκριμένα η νίτρωση και η καρβονυλίωση, αποτέλεσαν το βασικό αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, πρόκειται για μόνιμες τροποποιήσεις των πρωτεϊνών με σημαντικές επιπτώσεις στη λειτουργία τους, γεγονός που κάνει πιο επιτακτική την ανάγκη ταυτοποίησής τους<sup>44</sup>. Έτσι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τη ανίχνευσή τους είναι η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης, μιας ανοσοχημικής μεθόδου με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα, που δίνει και την δυνατότητα ταυτοποίησης συγκεκριμένων πρωτεϊνών, ιδιαίτερα όταν συνδυαστεί με τη μέθοδο της ανοσοκαθίζησης.

Αρχικά και η δική μας μελέτη εστίασε το ενδιαφέρον της σε ασθενείς που ήταν ενταγμένοι σε πρόγραμμα ΑΚΘ. Έτσι, πλάσμα από 25 αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς εκτιμήθηκε για τα επίπεδα των 3-νιτροτυροσινών, πάντα σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, οι 3-νιτροτυροσίνες προκύπτουν από την οξείδωση των τυροσινών που προκαλείται από RNS και η ανίχνευσή τους αποτελεί ένα ευαίσθητο και ειδικό δείκτη αυξημένου οξειδωτικού στρες στην ουραιμία. Άλλα προϊόντα της οξείδωσης των τυροσινών είναι οι 3-χλωροτυροσίνες και οι διτυροσίνες, ανάλογα με το αν το κυρίαρχο οξειδωτικό μέσο είναι το υποχλωριώδες οξύ ή μια ελεύθερη ρίζα (όπως η OH<sup>•</sup>), αντίστοιχα. Από όσα γνωρίζουμε μέχρι σήμερα, υπάρχουν λίγες μελέτες που ασχολήθηκαν με το φαινόμενο της οξείδωσης των τυροσινών των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών και σε καμία από αυτές δεν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης. Ο Himmelfarb και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες του πλάσματος των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών περιέχουν αυξημένα επίπεδα 3-χλωροτυροσινών αλλά όχι 3-νιτροτυροσινών ή διτυροσινών<sup>214</sup>, ενώ ο Thuraisingham, με τη βοήθεια της ανοσοιστοχημείας, διαπίστωσε αυξημένα επίπεδα 3-νιτροτυροσινών στους νεφρούς ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια<sup>64</sup>. Επίσης, πολύ πρόσφατα, ο Piroddi μελέτησε τις πρωτεΐνες που χάνονται στα υπερδιηθήματα (ultrafiltrate) των ασθενών που υποβάλλονται σε ΑΚΘ, με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης και διαπίστωσε ότι η αλβουμίνη και η τρανσφερίνη αποτελούν επιλεκτικούς στόχους νίτρωσης<sup>365</sup>. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας ένα ειδικό αντίσωμα που ανιχνεύει 3-νιτροτυροσίνες σε δείγματα πλάσματος, βρέθηκε ότι σε όλους τους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς και για όλες σχεδόν τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν τα επίπεδα των 3-νιτροτυροσινών ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, ένα εύρημα που υποδηλώνει την ύπαρξη των αυξημένων επιπέδων οξειδωτικού στρες σε αυτούς τους ασθενείς. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα του Himmelfarb που, όπως προαναφέρθηκε, ναι μεν διαπίστωσε αυξημένα επίπεδα 3-χλωροτυροσινών όχι όμως και 3-νιτροτυροσινών στο

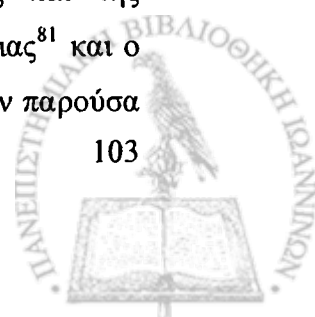




πλάσμα αυτών των ασθενών<sup>214</sup>. Αυτή η διαφορά, πιθανά, συσχετίζεται με τη διαφορετική τεχνική που χρησιμοποιείται κάθε φορά για την ανίχνευση των οξειδωμένων τυροσινών, καθώς είναι γνωστό ότι εύκολα οι 3-νιτροτυροσίνες μπορούν να αναχθούν σε 3-αμινοτυροσίνες όταν τα δείγματα πλάσματος υποστούν βρασμό κάτω από αναγωγικές συνθήκες και ιδιαίτερα όταν τα δείγματα αυτά περιέχουν σε μεγάλη περιεκτικότητα αιμοπρωτεΐνες<sup>366</sup>.

Το ενδιαφέρον, επίσης, της μελέτης μας εστιάζεται και στο γεγονός της παρουσίας των 3-νιτροτυροσινών και στους υγείς μάρτυρες, ένα εύρημα που επιβεβαιώνει παλαιότερες παρατηρήσεις που ανέφεραν την παρουσία τους σε διάφορους φυσιολογικούς ιστούς, όπως τον νευρικό ιστό, τα αγγεία, την καρδιά, τους πνεύμονες, το ήπαρ, τους νεφρούς, το πάγκρεας, τους σκελετικούς μύες, το δέρμα, τον στοματικό βλεννογόνο, τον θύμο αδένα και τις ωοθήκες, αλλά και σε βιολογικά υγρά όπως το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και το πλάσμα<sup>61-64</sup>. Και αυτό το εύρημα είναι πολύ σημαντικό, καθώς φαίνεται ότι ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι 3-νιτροτυροσίνες μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, όπως στις διεργασίες μεταγωγής σημάτων<sup>78,83</sup>.

Η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των 3-νιτροτυροσινών, όπως ήδη έχουμε αναφέρει, δίνει και τη δυνατότητα εκτίμησης των MB των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι τα MB των πρωτεϊνών που, με βάση τη στατιστική μας μελέτη, είχαν υποστεί νίτρωση σε σημαντικότερο βαθμό, ήταν των 156, 110, 79, 67 και 49 kD. Άμεσα το επόμενο ερώτημα είναι το ποιες είναι αυτές οι πρωτεΐνες και ποιες οι επιπτώσεις του φαινομένου της νίτρωσης στη λειτουργία τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοκαθίζησης, με την οποία απομονώσαμε τις 3-νιτροτυροσίνες και στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε αντισώματα έναντι συγκεκριμένων πρωτεϊνών που θέλαμε να ελέγξουμε την παρουσία τους ανάμεσα σε αυτές που είχαν υποστεί νίτρωση. Η επιλογή των πρωτεϊνών αυτών ήταν αρκετά δύσκολη αφού το φαινόμενο της νίτρωσης είναι ένα εκλεκτικό φαινόμενο που εξαρτάται από ένα πλήθος παραγόντων<sup>49</sup>. Ήδη, με βάση τα παραπάνω MB θα μπορούσαμε να υποψιαστούμε κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες, όπως την τρανσφερίνη (για την μάντα των 79kD) και την αλβουμίνη (για την μάντα των 67kD). Η επιλογή μας, όμως, στηρίχτηκε κυρίως σε προηγούμενες μελέτες στις οποίες είχε εξεταστεί το φαινόμενο της νίτρωσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών, όπως της σερούλοπλασμίνης, του πλασμινογόνου, του ινωδογόνου, της τρανσφερίνης και της αλβουμίνης, σε νοσήματα, όπως το σύνδρομο της οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας<sup>81</sup> και ο καρκίνος του πνεύμονα<sup>80</sup>. Έτσι, με βάση τις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα



μελέτη αντισώματα, για ορισμένες από αυτές τις πρωτεΐνες, για τις οποίες ήδη είχε βρεθεί ότι υφίστανται νίτρωση. Η σερουλοπλασμίνη, η τρανσφερίνη και η αλβουμίνη ήταν οι τρεις πρωτεΐνες των οποίων η νίτρωση ελέγχθηκε σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς και υγιείς μάρτυρες στην παρούσα μελέτη. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι η σερουλοπλασμίνη είναι από τις πρωτεΐνες που υφίστανται νίτρωση και μάλιστα στατιστικά σημαντικά υψηλότερη στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, ενώ η αλβουμίνη, ναί μεν ανιχνεύτηκε ανάμεσα στις πρωτεΐνες που υφίστανται νίτρωση, ο βαθμός όμως αυτής της νίτρωσης δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από τα υγιή άτομα, παρόλο που ήταν μεγαλύτερη. Όσον αφορά την τρανσφερίνη, δεν κατέστη δυνατόν να ανιχνευτεί ανάμεσα στις νιτροτυροσίνες που απομονώσαμε με τη μέθοδο της ανοσοκαθίζησης, ούτε στα δείγματα των υγιών ατόμων ούτε και των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΑΚΘ. Αυτό το εύρημα πιθανά οφείλεται είτε στο γεγονός ότι αυτή η πρωτεΐνη δεν αποτελεί στόχο νίτρωσης στην ΑΚΘ, είτε, το πιθανότερο, στο ότι δεν καθιζάνει στις νιτροτυροσίνες που απομονώσαμε με τη μέθοδο της ανοσοκαθίζησης. Παρόλο που η επίδραση της νίτρωσης των τυροσινών στη λειτουργία των πρωτεϊνών δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, αυξημένα επίπεδα νίτρωσης φαίνεται ότι τροποποιούν τη δραστηριότητα συγκεκριμένων πρωτεϊνών, όπως της σερουλοπλασμίνης, του αναστολέα της αι πρωτεϊνάσης και του ινωδογόνου με αποτέλεσμα σημαντικές επιδράσεις σε λειτουργίες, όπως η ομοιοστασία των μετάλλων, η πρωτεόλυση και η πήξη<sup>49,81</sup>. Έτσι, η σημαντική νίτρωση των τυροσινών στους ασθενείς που υπόκεινται σε ΑΚΘ δεν αντικατοπτρίζουν μόνο τα υψηλότερα επίπεδα του οξειδωτικού στρες στους ασθενείς αυτούς, αλλά πιθανά αποτελούν και έμμεσο δείκτη διαταραχής της φυσιολογικής πρωτεϊνικής λειτουργίας.

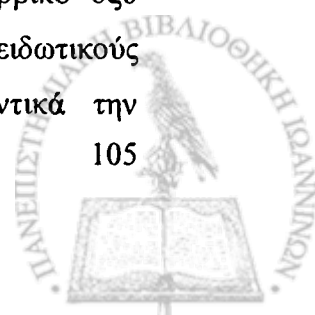
Σε δείγματα πλάσματος των 25 αυτών αιμοκαθαιρόμενων ασθενών εξετάστηκε στη συνέχεια και το φαινόμενο της καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η καρβονυλίωση αποτελεί μια άλλη οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών, με σημαντικές επιπτώσεις στη δομή και λειτουργία τους<sup>44</sup>. Για τον προσδιορισμό τους ακολουθήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης, χρησιμοποιώντας κατάλληλο αντίσωμα που δεσμεύεται στο DNP παράγωγο που δημιουργείται μετά την επίδραση του αντιδραστηρίου DNPΗ στις καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες. Η καρβονυλίωση της αλβουμίνης αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας. Η επιλογή της πρωτεΐνης αυτής στηρίχτηκε σε προηγούμενες παρατηρήσεις σύμφωνα με τις οποίες η αλβουμίνη αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του πλάσματος που υφίσταται καρβονυλίωση. Ο Himmelfarb, ήδη από το 2001, έδειξε ότι σε 25 αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς στους οποίους μελέτησε το φαινόμενο της



καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών του πλάσματος με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, η αλβουμίνη υφίσταται στατιστικά σημαντική καρβονυλίωση σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται, επίσης, ότι η τρανσφερίνη, το ινωδογόνο και οι ανοσοσφαιρίνες υφίστανται καρβονυλίωση εντονότερη σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, όχι όμως σε στατιστικά σημαντικό βαθμό<sup>107</sup>. Πιο πρόσφατα, ο Mera και οι συνεργάτες του, επιβεβαίωσαν αυτά τα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα οι μελετητές αυτοί, αφού εντόπισαν αρχικά, με φασματομετρικές μεθόδους, τα υψηλότερα επίπεδα των καρβονυλίων στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, εφάρμοσαν τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Διαπίστωσαν έτσι ότι τα αυξημένα αυτά επίπεδα των καρβονυλίων αφορούσαν κυρίως την αλβουμίνη. Περαιτέρω, μάλιστα, ανάλυση των δεδομένων τους, έδειξε ότι τα επίπεδα της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης ήταν ιδιαίτερα αυξημένα στους διαβητικούς ασθενείς<sup>217,235</sup>. Και η δική μας μελέτη επιβεβαίωσε αυτά τα αποτελέσματα. Πράγματι, και στους 25 αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς που μελετήθηκαν τα επίπεδα της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες.

Ο λόγος για τον οποίο η αλβουμίνη είναι από τις πρωτεΐνες οι οποίες κυρίως υφίστανται οξειδωτική τροποποίηση, δεν είναι ακόμη σαφής. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να σχετίζεται με την ικανότητα αυτής της πρωτεΐνης να συνδέει σίδηρο στο οξειδοαναγωγικό της κέντρο. Αυτή η ιδιότητα την κάνει ιδιαίτερα επιρρεπή όταν βρεθεί σε ένα περιβάλλον με αυξημένα επίπεδα  $H_2O_2$  και ελεύθερου σιδήρου, εξαιτίας της συμμετοχής της σε αντιδράσεις «τύπου Fenton» και της επακόλουθης αυξημένης παραγωγής των, εξαιρετικά δραστικών,  $OH\cdot$ . Ο Anraku έδειξε, όχι μόνο ότι η αλβουμίνη είναι η κύρια πρωτεΐνη που καρβονυλιώνεται στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, αλλά και ότι η ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου αυξάνει αυτήν την οξειδωτική τροποποίηση<sup>168</sup>. Ωστόσο, η αλβουμίνη έχει την ικανότητα να συνδέει σίδηρο ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Έτσι, η αλβουμίνη με την οξείδωσή της θυσιάζεται με σκοπό να προστατέψει άλλα μόρια επιρρεπή στην οξείδωση. Αυτή η ιδιότητα, σε συνδυασμό με τις υψηλές συγκεντρώσεις της στο πλάσμα, την καθιστούν ως ένα από τα κύρια αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού<sup>144</sup>.

Και η καρβονυλίωση μπορεί να επιφέρει σημαντικές επιπτώσεις στην λειτουργία των πρωτεϊνών και με αυτό τον τρόπο μπορεί να οδηγήσει στην εγκατάσταση και την εξέλιξη σοβαρών παθολογικών καταστάσεων. Καθώς η αλβουμίνη μαζί με το ασκορβικό οξύ αποτελούν τις κύριες γραμμές άμυνας του πλάσματος απέναντι σε διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες, η οξείδωση της αλβουμίνης μπορεί να τροποποιήσει σημαντικά την

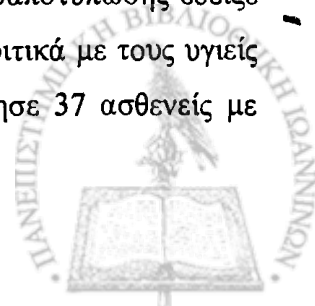


αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Ο Mera και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι η αλβουμίνη του πλάσματος των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών, που είναι οξειδωμένη σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, όπως προαναφέρθηκε, όχι μόνο είχε μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα, αλλά δρούσε και ως μεσολαβητής για την περαιτέρω ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων<sup>235</sup>. Οι ίδιοι μελετητές διαπίστωσαν, επίσης, ότι η οξείδωση της αλβουμίνης μπορεί να επηρεάσει και την ικανότητα σύνδεσής της με διάφορα φάρμακα, όπως τη βαρφαρίνη και την κετοπροφαίνη, τροποποιώντας έτσι τα επίπεδα των φαρμάκων αυτών στον ορό και κατά συνέπεια και τη διάρκεια δράσης τους.

Το ενδιαφέρον της μελέτης, επίσης, εστιάστηκε και σε ασθενείς που βρίσκονται στα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ, καθώς παρεμβάσεις στα στάδια αυτά πιθανά μπορούν να αποτρέψουν ή έστω να καθυστερήσουν την εξέλιξη της νόσου.

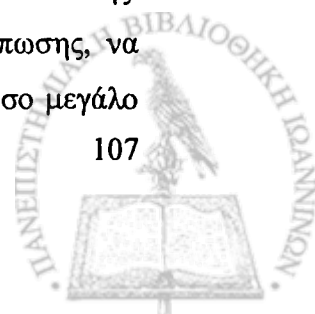
Είναι εμφανές ότι στους ασθενείς με ΧΝΝ, καθώς η νεφρική λειτουργία επιδεινώνεται, έχουμε μια τάση αύξησης των οξειδωτικών παραγόντων, αλλά και μείωσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, με αποτέλεσμα τη διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Έτσι, ουραιμικές τοξίνες, που φυσιολογικά μεταβολίζονται ή απεκκρίνονται από το νεφρό, συγκεντρώνονται στο πλάσμα και κινητοποιούν μηχανισμούς πρόκλησης οξειδωτικών βλαβών<sup>96</sup>. Η υποαλβουμιναιμία αυτών των ασθενών, κυρίως εξαιτίας της περιορισμένης σε λεύκωμα διατροφής<sup>143</sup>, αλλά και τα μειωμένα επίπεδα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, που φυσιολογικά παράγεται από τον νεφρό<sup>141;142</sup>, έχουν ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της αντιοξειδωτικής άμυνας σε αυτά τα άτομα. Το αποτέλεσμα, θεωρητικά, είναι τα αυξημένα επίπεδα του οξειδωτικού στρες.

Οι μελέτες που προσπάθησαν να προσεγγίσουν το οξειδωτικό στρες στα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ είναι λίγες και με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ο Himmelfarb ήταν από τους πρώτους που, σε ένα μικρό αριθμό ασθενών (10 υγιή άτομα, 10 ασθενείς σε ΑΚΘ και 10 ασθενείς με ΧΝΝ), διαπίστωσε αύξηση των επιπέδων των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών και μείωση των θειολικών ομάδων του πλάσματος, ακόμη και σε ασθενείς που δεν υποβάλλονταν σε καμία μέθοδο υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας. Για τον προσδιορισμό των καρβονυλίων, στη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ELISA<sup>106</sup>. Λίγο αργότερα ο ίδιος ερευνητής, σε 20 ασθενείς με ΧΝΝ προτελικού σταδίου διαπίστωσε μια σημαντική αύξηση της καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών όταν αυτή προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ELISA. Στους ίδιους όμως ασθενείς η εφαρμογή της μεθόδου της ανοσοαποτύπωσης έδειξε μια ήπια αύξηση της οξείδωσης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν, συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες, η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική<sup>107</sup>. Ο Annuk μελέτησε 37 ασθενείς με 106



μέση GFR 25ml/min και παρατήρησε μια αύξηση των προϊόντων της λιπιδιακής υπεροξειδωσης, τα οποία μάλιστα συσχετιζόταν με το βαθμό της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας των ασθενών αυτών<sup>367</sup>. Αργότερα ο Oberg και οι συνεργάτες του, ενώ παρατήρησαν μια σημαντική αύξηση των επιπέδων των F<sub>2</sub> ισοπροστανίων και των καρβονυλίων, όπως και μια σημαντική μείωση των θειολικών ομάδων, σε 60 ασθενείς με ΧΝΝ σταδίων 3 έως 5, δεν κατάφεραν να συσχετίσουν αυτά τα επίπεδα με το βαθμό έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας. Οι ίδιοι όμως μελετητές παραδέχτηκαν ότι ο αριθμός των ασθενών που μελέτησαν ήταν μικρός και ότι η κατανομή των ασθενών σε κάθε στάδιο δεν ήταν αντιπροσωπευτική, καθώς το 60% αυτών των ασθενών ήταν σταδίου 4 και 5<sup>208</sup>. Ακολούθησαν μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και με πιο αντιπροσωπευτική κατανομή στα διάφορα στάδια της ΧΝΝ. Από τα δεδομένα που υπάρχουν έως τώρα, είναι περιορισμένες οι βασικές μελέτες που έδειξαν μια ισχυρή συσχέτιση των αυξημένων παραγόντων του οξειδωτικού στρες με το βαθμό έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας. Ο Witko-Sarsat μελέτησε τα τελικά προϊόντα οξειδωσης των πρωτεϊνών (AOPP) σε 162 ασθενείς με ΧΝΝ και διαπίστωσε μια ισχυρή αντίστροφη συσχέτιση των επιπέδων αυτών με τον GFR<sup>368</sup>. Ο Terawaki και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα της οξειδωμένης μορφής της αλβουμίνης αυξανόταν προοδευτικά με το βαθμό έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας<sup>236</sup>. Πιο πρόσφατα, σε 159 ασθενείς σταδίων ΧΝΝ 1 έως 5, διαπιστώθηκε ότι δείκτες αυξημένου οξειδωτικού στρες, όπως η μηλονική διαλδεύδη (MDA) και η οξειδωμένη μορφή της LDL, αυξάνονταν καθώς η νεφρική λειτουργία επιδειωνόταν, ενώ και τα διάφορα αντιοξειδωτικά που προσδιορίστηκαν, όπως η δισμουτάση του σουπεροξειδίου των ερυθροκυττάρων, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, το σελήνιο του πλάσματος και ο ερυθροκυτταρικός χαλκός και ψευδάργυρος, ελαττώνονται με την πρόοδο της νόσου<sup>369</sup>. Ο Tang, επίσης, παρατήρησε ότι τα επίπεδα της 8-υδρόξυ-2-δεοξυγουανοσίνης του DNA των λευκοκυττάρων, μιας σημαντικής παραμέτρου εκτίμησης των οξειδωτικών βλαβών του DNA, αυξάνονται με την πρόοδο της ΧΝΝ<sup>370</sup>. Τέλος σημαντική ήταν η παρατήρηση της Dounousi και των συνεργατών της που έδειξαν μια ισχυρή αντίστροφη συσχέτιση των επιπέδων των F<sub>2</sub> ισοπροστανίων με τον GFR σε 87 ασθενείς με ΧΝΝ σταδίων 1-4<sup>209</sup>. Παρόμοια ήταν και τα πολύ πρόσφατα αποτελέσματα του Karamouzi και των συνεργατών του<sup>203</sup>.

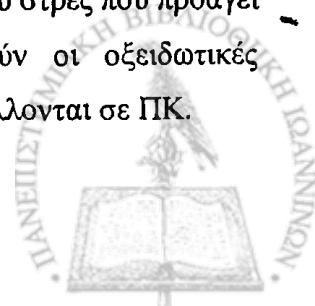
Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε τόσο το φαινόμενο της νίτρωσης αλλά και της καρβονυλίωσης σε 81 ασθενείς με ΧΝΝ σταδίων 2-4 με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Είναι η πρώτη φορά που γίνεται προσπάθεια, με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, να προσδιοριστούν τα επίπεδα των 3-νιτροτυροσινών και των καρβονυλίων σε ένα τόσο μεγάλο



αριθμό ασθενών με ΧΝΝ και με τόσο αντιπροσωπευτική κατανομή σε όλα τα στάδια της νόσου.

Αρχικά στους ασθενείς αυτούς εξετάστηκε το φαινόμενο της νίτρωσης. Διαπιστώθηκε, λοιπόν, ότι παρόλο που τα επίπεδα των 3-νιτροτυροσινών ήταν αυξημένα στους ασθενείς με ΧΝΝ, για κανένα στάδιο ΧΝΝ και για καμία πρωτεΐνη δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση. Αντίθετα, με τη χρησιμοποίηση αντισώματος που ανιχνεύει τις καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες, παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της καρβονυλίωσης της αλβουμίνης, σε σύγκριση με τους υγιείς, για τα στάδια 3 και 4 ΧΝΝ. Τι είναι αυτό όμως που οδηγεί στην εμφάνιση διαφορετικών επιπέδων νίτρωσης και καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών στους ασθενείς με ΧΝΝ; Αρχικά πρέπει να τονιστεί ότι και οι δύο τεχνικές ανίχνευσης των οξειδωτικών αυτών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών είναι εξίσου ειδικές και ευαίσθητες. Άρα η διαφορά αυτή, δεν οφείλεται στη διαφορετική ευαισθησία της κάθε τεχνικής. Πιθανά, όμως, η διαφορά αυτή οφείλεται στο μεγαλύτερο ποσοστό καρβονυλίωσης σε σύγκριση με τη νίτρωση αυτών των πρωτεϊνών. Πράγματι, είναι γνωστό ότι το NO<sup>-</sup>, το οποίο αποτελεί το κεντρικό μόριο για τη δημιουργία των RNS, συμμετέχει σε ένα πλήθος άλλων αντιδράσεων, πέρα από τη συμμετοχή του στη δημιουργία των νιτροτυροσινών. Μεταξύ αυτών των αντιδράσεων σημαντική είναι η αλληλεπίδρασή του με τις αιμοπρωτεΐνες, όπως την αιμοσφαιρίνη. Αυτή η αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα τη μικρότερη συμμετοχή του τόσο στη δημιουργία RNS και κυρίως του ONOO<sup>-</sup>, όσο και στις επακόλουθες οξειδωτικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών. Έτσι, τα επίπεδα των 3-νιτροτυροσινών τα οποία ανιχνεύουμε δεν αντιπροσωπεύουν την ακριβή έκταση των οξειδωτικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών. Αυτό το εμπόδιο προσπαθήσαμε να υπερκεράσουμε με τον προσδιορισμό των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών. Τέλος, πρέπει να τονίσουμε ότι ακόμη και οι ασθενείς σταδίου 2 έχουν αυξημένα επίπεδα οξειδωτικά τροποποιημένων πρωτεϊνών, παρόλο που δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Αυτή η παρατήρηση είναι ιδιαίτερα σημαντική, αφού αυτό το πρώιμο στάδιο αποτελεί, πιθανά, το κριτικό σημείο που πρέπει να παρέμβουμε για να τροποποιήσουμε ευνοϊκά την εξέλιξη της νόσου.

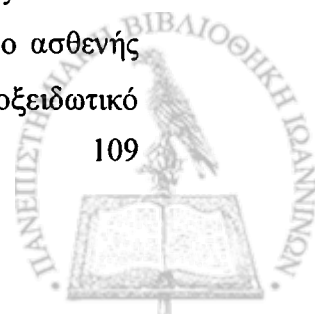
Το δεύτερο βασικό ερώτημα που θέσαμε εξ αρχής και στο οποίο η παρούσα μελέτη προσπάθησε να δώσει απάντηση, είναι το αν οι δύο μέθοδοι εξωνεφρικής κάθαρσης, η ΑΚΘ και η ΠΚ, διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες που προάγει η κάθε μια μέθοδος. Έτσι θεωρήθηκε απαραίτητο να εξετασθούν οι οξειδωτικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών του πλάσματος και σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ΠΚ.



Από τα δεδομένα που υπάρχουν, είναι η πρώτη φορά που εκτιμήθηκαν τα φαινόμενα της νίτρωσης και της καρβονυλίωσης, με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ΠΚ. Οι περισσότερες μελέτες που επιβεβαίωναν την ύπαρξη των αυξημένων επιπέδων οξειδωτικού στρες σε αυτούς τους ασθενείς, αφορούσαν κυρίως τον προσδιορισμό των AGEs προϊόντων, είτε στο πλάσμα, είτε στο διάλυμα της περιτοναϊκής κοιλότητας<sup>154;229;371</sup>. Ο Rutkowski, όμως, πρόσφατα, διαπίστωσε αυξημένα επίπεδα προϊόντων λιπιδιακής υπεροξειδωσης (MDA, 4-HNE), αλλά και καρβονυλίων, όπως αυτά ανιχνεύτηκαν με φασματομετρικές μεθόδους, σε αυτούς τους ασθενείς<sup>229</sup>. Υπάρχουν, ωστόσο, πολύ λίγες συγκριτικές μελέτες μεταξύ των δύο μεθόδων υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, όσον αφορά τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες. Ήδη από το 1986 ο Taccone-Gallucci έδειξε ότι οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΠΚ είχαν σχετικά αυξημένα επίπεδα MDA αλλά σαφώς μικρότερα συγκριτικά με τους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς. Στην ίδια μελέτη επισημαίνεται επίσης ότι τα επίπεδα της βιταμίνης E των ασθενών αυτών ήταν υψηλότερα ακόμη και σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες<sup>372</sup>. Παρόμοιες ήταν και οι παρατηρήσεις μεταγενέστερων μελετητών<sup>373;374</sup>. Το 1999 ο Nourooz-Zadeh έδειξε ότι τα επίπεδα των ROOHs στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΠΚ ήταν αυξημένα, αλλά δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, σε αντίθεση με τους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς στους οποίους η αύξησή τους ήταν ιδιαίτερα στατιστικά σημαντική<sup>375</sup>. Λίγο αργότερα διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα των καρβονυλίων, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ELISA, ήταν χαμηλότερα στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΠΚ σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΚΘ<sup>376</sup>, ενώ, τέλος, ο Usberti, συγκρίνοντας τα επίπεδα προϊόντων της λιπιδιακής υπεροξειδωσης (MDA, 4-HNE) ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες ασθενών, έδειξε ότι τα επίπεδά τους ήταν σημαντικά υψηλότερα στην ΑΚΘ, ενώ υπήρχε επίσης μια θετική συσχέτιση με τον αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο αυτών των ασθενών<sup>197</sup>.

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώσαμε ότι όχι μόνο τα επίπεδα των 3-νιτροτυροσινών, αλλά και τα επίπεδα της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΠΚ, δεν διέφεραν σημαντικά (παρόλο που ήταν υψηλότερα), σε σύγκριση με τα επίπεδα των υγιών μαρτύρων. Αυτό το εύρημα έρχεται σε αντίθεση με τους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, στους οποίους η καρβονυλίωση της αλβουμίνης είναι σαφώς αυξημένη. Και το ερώτημα που προκύπτει είναι που οφείλεται αυτή η διαφορά;

Είναι λογικό να θεωρήσει κανείς ότι, εφόσον ένα μέρος του αυξημένου οξειδωτικού στρες της ουραιμίας οφείλεται στη συσσώρευση των ουραιμικών τοξινών, όταν ο ασθενής ενταχθεί σε μια από τις μεθόδους υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, το οξειδωτικό



του στρες θα περιοριστεί. Πράγματι, υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν μείωση των παραμέτρων του οξειδωτικού στρες, όπως της MDA και της 4-HNE, αλλά και αύξηση των θειολικών ομάδων του πλάσματος, μετά την ΑΚΘ<sup>106;128;197</sup>. Επίσης, έχει αναφερθεί μείωση των επιπέδων των ΑΟΡΡ μετά την ένταξη των ασθενών με νεφρική ανεπάρκεια σε ΠΚ<sup>377</sup>. Φαίνεται, όμως, ότι η ένταξη των ασθενών αυτών σε μια από τις μεθόδους υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας δεν αρκεί για τον περιορισμό του οξειδωτικού τους στρες, καθώς η ίδια η μέθοδος, διαμέσου διαφόρων μηχανισμών, συμβάλλει στην διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Αυτό αφορά κυρίως την ΑΚΘ. Ο κύριος λόγος αφορά την επαφή των λευκοκυττάρων του αίματος με τις συνδέσεις και τις μεμβράνες της τεχνικής, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους και την επακόλουθη παραγωγή οξειδωτικών παραγόντων<sup>145-148</sup>. Όσον αφορά την ΠΚ, είναι λογικό ότι η τεχνική αυτή είναι περισσότερο 'βιοσυμβατή', καθώς το βασικό ρόλο της απομάκρυνσης των ουραιμικών τοξινών τον επιτελεί η περιτοναϊκή μεμβράνη. Σημαντικός, επίσης, φαίνεται ότι είναι και ο ρόλος της διατήρησης της υπολειπόμενης νεφρικής λειτουργίας των ασθενών που υποβάλλονται σε ΠΚ<sup>378</sup> με αποτέλεσμα τη διατήρηση και της ικανότητας, έστω και περιορισμένης, της ενδογενούς απομάκρυνσης κάποιων τοξικών ουσιών από την κυκλοφορία. Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι οι αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς υποβάλλονται συχνότερα σε ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου, με αποτέλεσμα την επίταση των ήδη αυξημένων επιπέδων του οξειδωτικού στρες αυτών των ασθενών<sup>163-169;379</sup>. Τέλος, η μη σημαντική αύξηση των επιπέδων της καρβονυλιωμένης αλβουμίνης στους ασθενείς που υποβάλλονται σε ΠΚ μπορεί να έχει άμεση σχέση με την αυξημένη απώλεια αυτής της πρωτεΐνης στο περιτοναϊκό διάλυμα<sup>161</sup>. Παρόλο δηλαδή που η συγκέντρωση της αλβουμίνης, η οποία χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του φαινομένου της καρβονυλίωσης, είναι η ίδια για τα υγιή άτομα, τους αιμοκαθαιρόμενους και τους ασθενείς σε ΠΚ, ενδέχεται η μεγαλύτερη απώλεια πρωτεΐνης στους ασθενείς σε ΠΚ να οδηγεί σε ταχύτερη αναγέννησή της, δηλαδή σε αντικατάστασή της από «καινούργια», μη οξειδωμένη μορφή, με αποτέλεσμα και τα επίπεδα της καρβονυλίωσης αυτής της αλβουμίνης που εκτιμήθηκαν να είναι μικρότερα.

Το μεγαλύτερο μέρος της παρούσης μελέτης αφορά την εκτίμηση των οξειδωτικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών σε ασθενείς με ΧΝΝ. Όμως, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η έκθεση κυττάρων σε διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες προκαλεί τροποποιήσεις σε όλα τα βασικά συστατικά του, όπως και στο DNA. Μάλιστα, το DNA, αν και θεωρείται το πιο σημαντικό μόριο, καθώς είναι υπεύθυνο για την αποθήκευση και τη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας, είναι περισσότερο ευαίσθητο σε σύγκριση με τα υπόλοιπα κυτταρικά





συστατικά και υφίσταται σημαντικές βλάβες όταν εκτίθεται σε οξειδωτικούς παράγοντες. Παρόλα αυτά, είναι το λιγότερο καλά μελετημένο. Από προηγούμενες μελέτες που έγιναν στο εργαστήριό μας ήταν γνωστό ότι η έκθεση σε συνεχώς παραγόμενο  $H_2O_2$  προκαλεί, μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA ανθρώπινων Τ-λεμφοκυττάρων, όπως αυτές εκτιμήθηκαν με την τεχνική comet assay<sup>380</sup>. Αυτό το εύρημα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι ασθενείς με τελικό στάδιο ΧΝΝ και ιδιαίτερα οι ασθενείς που υποβάλλονται σε ΑΚΘ, εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη επίπτωση, σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό, διαφόρων μορφών νεοπλασιών (τόσο συμπαγών οργάνων όσο και λεμφωμάτων)<sup>381-385</sup>, μας οδήγησε στην προσπάθεια εκτίμησης του ποσοστού βλάβης του DNA των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της comet assay<sup>359</sup>, με την οποία μπορούμε να ανιχνεύσουμε θραύσματα στις μονές αλυσίδες του DNA με πολύ μεγάλη ευαισθησία (ένα σπάσιμο ανά  $10^7$  βάσεις). Προηγήθηκαν μελέτες που διαπίστωσαν αυξημένο ποσοστό βλάβης στο DNA των ασθενών με ΧΝΝ. Έτσι ο Tarng ανακοίνωσε ότι τα επίπεδα της 8-υδρόξυ-2-δεοξυγουανোসίνης του DNA των λευκοκυττάρων, μιας σημαντικής παραμέτρου εκτίμησης των οξειδωτικών βλαβών του DNA, είναι σημαντικά αυξημένα τόσο σε ασθενείς με ΧΝΝ και πολύ περισσότερο σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ΑΚΘ ή ΠΚ<sup>370,386</sup>. Ο Stopper, επίσης εφάρμοσε την τεχνική της comet assay για τον προσδιορισμό των βλαβών του DNA των λεμφοκυττάρων ασθενών με ΧΝΝ και διαπίστωσε μια αύξηση αυτών των βλαβών σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, ιδιαίτερα σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΚΘ για >10έτη<sup>387</sup>. Η μελέτη μας επιβεβαίωσε αυτά τα αποτελέσματα, αφού διαπιστώθηκε ένα σημαντικό ποσοστό σχάσεων στο DNA των λεμφοκυττάρων των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών. Αυτό επίσης που παρατηρήθηκε είναι ότι σε δείγματα αίματος μετά την ΑΚΘ το ποσοστό της βλάβης ήταν μικρότερο, ένα εύρημα που υποδηλώνει, πιθανά, την απομάκρυνση των λεμφοκυττάρων με υψηλό ποσοστό βλάβης κατά τη συνεδρία της ΑΚΘ.

Συμπερασματικά, λοιπόν, φαίνεται ότι οι ασθενείς με ΧΝΝ εκτίθενται σε αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες, όπως αυτό προσδιορίζεται από την εκτίμηση διαφόρων οξειδωτικών παραμέτρων, αρκετά νωρίς κατά την εξέλιξη της νόσου. Το οξειδωτικό στρες φαίνεται ότι επιτείνεται μετά την ένταξη του ασθενούς σε πρόγραμμα ΑΚΘ, κάτι που δεν φαίνεται να επιβεβαιώνεται και για την ΠΚ. Το γεγονός αυτό θέτει ισχυρές υπόνοιες για την υπεροχή της ΠΚ όσον αφορά την συμμετοχή της μεθόδου υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας στα υψηλά επίπεδα του οξειδωτικού στρες αυτών των ασθενών.

## Θ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Το οξειδωτικό στρες φαίνεται ότι εμφανίζεται νωρίς στην εξέλιξη της ΧΝΝ, όπως υποσημαίνεται από τα υψηλότερα επίπεδα νιτροτυροσινών και καρβονυλίων, σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, ακόμη και στους ασθενείς με στάδιο 2 ΧΝΝ. Ιδιαίτερα στους ασθενείς με στάδιο 3 και 4 ΧΝΝ η αύξηση των καρβονυλίων, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, είναι στατιστικά σημαντική.
2. Το οξειδωτικό στρες επιτείνεται με την ένταξη του ασθενούς στην ΑΚΘ, γεγονός που δεν επιβεβαιώνεται για τους ασθενείς που εντάσσονται σε πρόγραμμα ΠΚ. Έτσι, ενώ και οι νιτροτυροσίνες και τα καρβονύλια είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς σε ΑΚΘ σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, στους ασθενείς που υποβάλλονται σε ΠΚ, και μάλιστα είναι αυξημένα αλλά όχι στατιστικά σημαντικά σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Πιθανά, λοιπόν, η ΠΚ να αποτελεί μια περισσότερο 'βιοσυμβατή' μέθοδο υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας.
3. Ο προσδιορισμός των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών φαίνεται να αποτελεί μια πιο ακριβή μέθοδο εκτίμησης του οξειδωτικού στρες στη ΧΝΝ σε σύγκριση με τον προσδιορισμό των νιτροτυροσινών, αφού οι πολλαπλοί, πολύπλοκοι μηχανισμοί δράσης του NO, πιθανά, δεν παρέχουν τη δυνατότητα νίτρωσης των πρωτεϊνών σε τέτοιο βαθμό που να αντιστοιχεί στα επίπεδα αύξησης του οξειδωτικού στρες.
4. Η σερουλοπλασμίνη είναι από τις πρωτεΐνες του πλάσματος που φαίνεται ότι υφίσταται νίτρωση σε σημαντικό βαθμό, ενώ η αλβουμίνη είναι η κύρια πρωτεΐνη του πλάσματος που καρβονυλιώνεται στους ασθενείς με ΧΝΝ.
5. Τέλος, σημαντική φαίνεται να είναι η βλάβη του DNA των λεμφοκυττάρων των ασθενών που υποβάλλονται σε ΑΚΘ, όπως αυτό επισημαίνεται από την σημαντική αύξηση των σχάσεων του DNA, με τη μέθοδο comet assay, στους ασθενείς αυτούς.

## I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός των ασθενών με ΧΝΝ αλλά και οι σημαντικές μακροπρόθεσμες επιπλοκές της νόσου, με κυριότερη την καρδιαγγειακή νοσηρότητα, έχουν καταστήσει επιτακτική την ανάγκη της πολυπαραγοντικής προσέγγισης και αντιμετώπισης της νόσου. Τα τελευταία χρόνια, μεταξύ των άλλων παραγόντων κινδύνου, αναγνωρίστηκε και ο σημαντικός ρόλος του οξειδωτικού στρες, τόσο στην εγκατάσταση και εξέλιξη της ΧΝΝ, όσο και στην εμφάνιση των επιπλοκών της. Οι περισσότερες μελέτες, έως τώρα, αφορούσαν ασθενείς που ήδη υποβάλλονταν σε μια από τις μεθόδους υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας και κυρίως σε ΑΚΘ. Λίγα δεδομένα, όμως, είναι γνωστά σχετικά με το πόσο νωρίς αρχίζει το οξειδωτικό στρες στην εξέλιξη της νόσου. Το γεγονός, μάλιστα, ότι υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι ο καρδιαγγειακός κίνδυνος στους ασθενείς αυτούς είναι αυξημένος από πολύ νωρίς στην εξέλιξη της νόσου, κάνει επιτακτική την ανάγκη πιο ενδεδειγμένης προσέγγισης αυτών των ασθενών. Σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν να προσδιοριστούν τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες τόσο στους ασθενείς με ΧΝΝ και διαφόρου βαθμού έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας, όσο και στους ασθενείς που υποβάλλονται σε εξωνεφρική κάθαρση, είτε με ΑΜΚ είτε με ΠΚ. Το ενδιαφέρον, επίσης, εστιάστηκε, στη σύγκριση των δύο μεθόδων υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, όσον αφορά τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες.

Εκατόν είκοσι επτά ασθενείς με ΧΝΝ που ταξινομήθηκαν σε 5 ομάδες (ασθενείς με ΧΝΝ σταδίων 2, 3 και 4, ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΚΘ και ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΠΚ) και 20 υγιείς μάρτυρες μελετήθηκαν για τα επίπεδα της νίτρωσης και της καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών του πλάσματος. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων δέσμευσης των νιτροτυροσινών και των καρβονυλίων. Έγινε, επίσης, προσπάθεια ταυτοποίησης των πρωτεϊνών του πλάσματος των αιμοκαθαρόμενων ασθενών που υφίστανται νίτρωση με τη βοήθεια της μεθόδου της ανοσοκαθίζησης και τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι νιτροτυροσινών, συνδεδεμένο με αγαρόζη. Ακολούθησε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων πρωτεϊνών (της σερουλοπλασμίνης, της αλβουμίνης και της τρανσφερίνης). Τέλος εκτιμήθηκε το ποσοστό βλάβης του DNA των λεμφοκυττάρων των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΑΚΘ με τη μέθοδο comet assay.

Σημαντικά αυξημένα επίπεδα νιτροτυροσινών ( $p < 0.001$ ), διαπιστώθηκαν στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και για όλες τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν (και που αντιστοιχούσαν στα MB των 156, 110, 79, 67, και 49 kD), πλην της πρωτεΐνης που αντιστοιχούσε στο MB των 29 kD. Οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΠΚ, όπως και οι ασθενείς με ΧΝΝ σταδίων 2, 3 και 4, παρόλο που είχαν αυξημένα επίπεδα νιτροτυροσινών, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, η αύξηση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική για καμία από τις πρωτεΐνες που εξετάστηκαν. Η καρβονυλίωση της αλβουμίνης, τόσο των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών, όσο και των ασθενών με σταδίου 3 και 4 ΧΝΝ ήταν στατιστικά σημαντική, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$  αντίστοιχα). Ωστόσο, στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΠΚ, αν και η καρβονυλίωση της αλβουμίνης ήταν μεγαλύτερη από αυτή των υγιών μαρτύρων, αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η σερουλοπλασμίνη διαπιστώθηκε να είναι η κύρια πρωτεΐνη που υφίσταται νίτρωση στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, σε σημαντικό μάλιστα βαθμό σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες ( $p < 0.05$ ). Η αλβουμίνη ανιχνεύτηκε ανάμεσα στις πρωτεΐνες που υφίστανται νίτρωση, χωρίς όμως ο βαθμός αυτής να διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τα υγιή άτομα. Όσον αφορά την τρανσφερίνη δεν κατέστη δυνατό να ανιχνευτεί ανάμεσα στις νιτροτυροσίνες που απομονώθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοκαθίζησης, ούτε στα δείγματα των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών ούτε και των υγιών ατόμων. Τέλος σημαντικό ποσοστό σχάσεων του DNA των λεμφοκυττάρων διαπιστώθηκε στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς ( $p < 0.01$ ) σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Παρόλο που το ποσοστό αυτό της βλάβης φάνηκε να μειώνεται μετά την ΑΚΘ, αυτή η μείωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Συμπερασματικά φαίνεται ότι το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται νωρίς στην εξέλιξη της ΧΝΝ και επιτείνεται με την ένταξη του ασθενούς στην ΑΚΘ, όχι όμως και στην ΠΚ. Έτσι η ΠΚ, πιθανά, αποτελεί πιο 'βιοσυμβατή' μέθοδο υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας σε σύγκριση με την ΑΚΘ. Επίσης, ο προσδιορισμός των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών φαίνεται να αποτελεί μια πιο ακριβή μέθοδο εκτίμησης του οξειδωτικού στρες στη ΧΝΝ σε σύγκριση με τον προσδιορισμό των νιτροτυροσινών, αφού οι πολλαπλοί, πολύπλοκοι μηχανισμοί δράσης του NO, πιθανά, δεν παρέχουν τη δυνατότητα νίτρωσης των πρωτεϊνών σε τέτοιο βαθμό που να αντιστοιχεί στα επίπεδα αύξησης του οξειδωτικού στρες.



## IA. SUMMARY

### OXIDATIVE STRESS IN CHRONIC RENAL FAILURE

Oxidative damage has been reported to be increased in uremic patients and thus has been suggested as a possible risk factor contributing to the pathogenesis of cardiovascular complications and the progression of chronic kidney disease (CKD). Although, several studies have evaluated the levels of oxidative stress in hemodialysis (HD) patients, little is known about the oxidative damage in predialysis and peritoneal dialysis (PD) patients. The aim of the present investigation was to evaluate the relative levels of systemic oxidative stress in predialysis, hemodialysis and peritoneal dialysis patients, as indicated by the oxidative modifications in plasma proteins and the DNA damage of lymphocytes.

Plasma samples from 20 apparently healthy control individuals and 127 CKD patients were evaluated, by Western blot analysis, for the estimation of the levels of protein nitration and carbonyl formation. Patients were divided in 5 groups: CKD patients of stages 2, 3 and 4, according to the severity of the disease, HD and PD patients. Also, immunoprecipitation of plasma proteins of HD patients by antinitrotyrosine-agarose conjugated antibodies, followed by Western blotting, was used in an attempt to identify the nitrated proteins. Finally, the DNA damage of lymphocytes of HD patients was evaluated by comet assay technique.

Although several proteins with nitrated tyrosine residues were observed in plasma of healthy individuals, increased nitration levels were observed in some specific proteins in all HD patients tested compared with controls ( $p < 0.001$ ). At least 6 apparent bands appeared to be more nitrated than their counterparts in plasma from controls. Although protein nitration was also higher in predialysis and PD patients, the difference did not reach significance. Albumin represented the main plasma carbonylated protein. Increasing carbonylation of albumin was detected along with the severity of chronic kidney disease, reaching significance at stages 3 and 4 ( $p < 0.01$  compared to healthy controls). The carbonylation of albumin was even higher in the plasma of HD patients ( $p < 0.001$ ), while in PD patients it was not statistically significant compared to controls. Ceruloplasmin was identified as one of the proteins which was significantly increased in HD patients compared to healthy controls ( $p < 0.05$ ). Finally, the DNA damage of lymphocytes in HD patients was significantly increased compared to healthy controls ( $p < 0.01$ ).



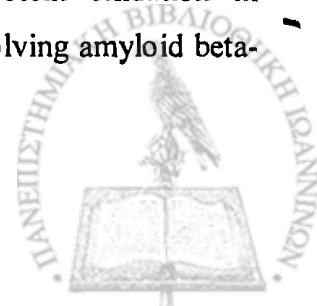
The data presented in this work indicate that oxidative stress in CKD patients is gradually increased during the development of the disease. This stress was intensified during HD, but it was less in PD subjects, suggesting that this method is, perhaps, a more biocompatible dialysis technique.



## ΙΒ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. El Nahas M: The global challenge of chronic kidney disease. *Kidney Int* 68:2918-2929, 2005
2. Nwankwo E, Bello AK, El Nahas AM: Chronic kidney disease: stemming the global tide. *Am J Kidney Dis* 45:201-208, 2005
3. Lysaght MJ: Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications. *J Am Soc Nephrol* 13 Suppl 1:S37-S40, 2002
4. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 39:S1-266, 2002
5. Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G, Levey AS: Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis* 41:1-12, 2003
6. Hallan S, Asberg A, Lindberg M, Johnsen H: Validation of the Modification of Diet in Renal Disease formula for estimating GFR with special emphasis on calibration of the serum creatinine assay. *Am J Kidney Dis* 44:84-93, 2004
7. Lin J, Knight EL, Hogan ML, Singh AK: A comparison of prediction equations for estimating glomerular filtration rate in adults without kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 14:2573-2580, 2003
8. Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS: Assessing kidney function--measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med* 354:2473-2483, 2006
9. Agarwal R: Estimating GFR from serum creatinine concentration: pitfalls of GFR-estimating equations. *Am J Kidney Dis* 45:610-613, 2005
10. Keith DS, Nichols GA, Gullion CM, Brown JB, Smith DH: Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch Intern Med* 164:659-663, 2004

11. Lysaght MJ, Vonesh EF, Gotch F, Ibels L, Keen M, Lindholm B, Nolph KD, Pollock CA, Prowant B, Farrell PC: The influence of dialysis treatment modality on the decline of remaining renal function. *ASAIO Trans* 37:598-604, 1991
12. Di Giulio S, Meschini L, Triolo G: Dialysis outcome quality initiative (DOQI) guideline for hemodialysis adequacy. *Int J Artif Organs* 21:757-761, 1998
13. Mitchell JB, Russo A, Kuppusamy P, Krishna MC: Radiation, radicals, and images. *Ann N Y Acad Sci* 899:28-43, 2000
14. COMMONER B, TOWNSEND J, PAKE GE: Free radicals in biological materials. *Nature* 174:689-691, 1954
15. GERSCHMAN R, GILBERT DL, NYE SW, DWYER P, FENN WO: Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119:623-626, 1954
16. McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055, 1969
17. McCord JM, Fridovich I: The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 244:6056-6063, 1969
18. McCord JM, Roy RS, Schaffer SW: Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. *Adv Myocardiol* 5:183-189, 1985
19. Cooke MS, Mistry N, Wood C, Herbert KE, Lunec J: Immunogenicity of DNA damaged by reactive oxygen species--implications for anti-DNA antibodies in lupus. *Free Radic Biol Med* 22:151-159, 1997
20. Butterfield DA: Amyloid beta-peptide [1-42]-associated free radical-induced oxidative stress and neurodegeneration in Alzheimer's disease brain: mechanisms and consequences. *Curr Med Chem* 10:2651-2659, 2003
21. Butterfield DA, Lauderback CM: Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-





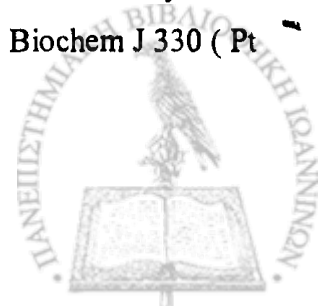
- peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 32:1050-1060, 2002
22. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A: Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med* 7:548-554, 2001
  23. Coyle JT, Puttfarcken P: Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695, 1993
  24. Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell B: An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68:2061-2069, 1997
  25. Louie S, Halliwell B, Cross CE: Adult respiratory distress syndrome: a radical perspective. *Adv Pharmacol* 38:457-490, 1997
  26. Gower JD: A role for dietary lipids and antioxidants in the activation of carcinogens. *Free Radic Biol Med* 5:95-111, 1988
  27. Kensler TW, Egner PA, Taffe BG, Trush MA: Role of free radicals in tumor promotion and progression. *Prog Clin Biol Res* 298:233-248, 1989
  28. Halliwell B, Zhao K, Whiteman M: Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic Res* 31:651-669, 1999
  29. Betteridge DJ: What is oxidative stress? *Metabolism* 49:3-8, 2000
  30. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA: Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 28:1456-1462, 2000
  31. Thannickal VJ, Fanburg BL: Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L1005-L1028, 2000
  32. Dusting GJ: Nitric oxide in cardiovascular disorders. *J Vasc Res* 32:143-161, 1995

33. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142, 1991
34. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D: Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 53:135-159, 2001
35. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1620-1624, 1990
36. Sies H: Oxidative stress II. Oxidants and antioxidants. Academic Press, London, 1991,
37. Halliwell B, Chirico S: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 57:715S-724S, 1993
38. Mylonas C, Kouretas D: Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13:295-309, 1999
39. Halliwell B: Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies. *Free Radic Res* 29:469-486, 1998
40. Martinez GR, Loureiro AP, Marques SA, Miyamoto S, Yamaguchi LF, Onuki J, Almeida EA, Garcia CC, Barbosa LF, Medeiros MH, Di Mascio P: Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutat Res* 544:115-127, 2003
41. Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE: The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 531:231-251, 2003
42. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324 ( Pt 1):1-18, 1997
43. Stadtman ER, Berlett BS: Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 30:225-243, 1998



44. Ghezzi P, Bonetto V: Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* 3:1145-1153, 2003
45. Berlett BS, Stadtman ER: Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272:20313-20316, 1997
46. Giasson BI, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM: Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 290:985-989, 2000
47. Giasson BI, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ: The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radic Biol Med* 32:1264-1275, 2002
48. Davies MJ: Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun* 305:761-770, 2003
49. Ischiropoulos H: Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* 305:776-783, 2003
50. Halliwell B: What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett* 411:157-160, 1997
51. Mohiuddin I, Chai H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C: Nitrotyrosine and chlorotyrosine: clinical significance and biological functions in the vascular system. *J Surg Res* 133:143-149, 2006
52. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS: Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 298:431-437, 1992
53. Reiter CD, Teng RJ, Beckman JS: Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J Biol Chem* 275:32460-32466, 2000
54. Gaut JP, Byun J, Tran HD, Lauber WM, Carroll JA, Hotchkiss RS, Belaouaj A, Heinecke JW: Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *J Clin Invest* 109:1311-1319, 2002

55. Brennan ML, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, Vadseth C, Narine L, Lenkiewicz E, Borchers MT, Lusic AJ, Lee JJ, Lee NA, Abu-Soud HM, Ischiropoulos H, Hazen SL: A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 277:17415-17427, 2002
56. Natake M, Ueda M: Changes in food proteins reacted with nitrite at gastric pH. *Nutr Cancer* 8:41-45, 1986
57. Pfeiffer S, Lass A, Schmidt K, Mayer B: Protein tyrosine nitration in cytokine-activated murine macrophages. Involvement of a peroxidase/nitrite pathway rather than peroxynitrite. *J Biol Chem* 276:34051-34058, 2001
58. Crow JP, Ischiropoulos H: Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: in vivo marker of peroxynitrite. *Methods Enzymol* 269:185-194, 1996
59. Shigenaga MK, Lee HH, Blount BC, Christen S, Shigeno ET, Yip H, Ames BN: Inflammation and NO(X)-induced nitration: assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3211-3216, 1997
60. Frost MT, Halliwell B, Moore KP: Analysis of free and protein-bound nitrotyrosine in human plasma by a gas chromatography/mass spectrometry method that avoids nitration artifacts. *Biochem J* 345 Pt 3:453-458, 2000
61. Strong MJ, Sopper MM, Crow JP, Strong WL, Beckman JS: Nitration of the low molecular weight neurofilament is equivalent in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and control cervical spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 248:157-164, 1998
62. Mehl M, Bidmon HJ, Hilbig H, Zilles K, Dringen R, Ullrich V: Prostacyclin synthase is localized in rat, bovine and human neuronal brain cells. *Neurosci Lett* 271:187-190, 1999
63. Khan J, Brennand DM, Bradley N, Gao B, Bruckdorfer R, Jacobs M: 3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. *Biochem J* 330 ( Pt 2):795-801, 1998

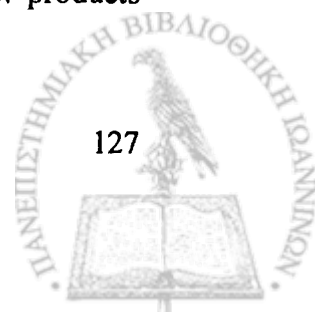


64. Thuraisingham RC, Nott CA, Dodd SM, Yaqoob MM: Increased nitrotyrosine staining in kidneys from patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 57:1968-1972, 2000
65. Buttery LD, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield EN, Parums DV, Yacoub MH, Polak JM: Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* 75:77-85, 1996
66. Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S: Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* 94:2407-2413, 1994
67. Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS: Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 151:1250-1254, 1995
68. Saleh D, Barnes PJ, Giaid A: Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 155:1763-1769, 1997
69. Bruijn LI, Beal MF, Becher MW, Schulz JB, Wong PC, Price DL, Cleveland DW: Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7606-7611, 1997
70. Chou SM, Wang HS, Taniguchi A: Role of SOD-1 and nitric oxide/cyclic GMP cascade on neurofilament aggregation in ALS/MND. *J Neurol Sci* 139 Suppl:16-26, 1996
71. Bagasra O, Michaels FH, Zheng YM, Bobroski LE, Spitsin SV, Fu ZF, Tawadros R, Koprowski H: Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12041-12045, 1995

72. Good PF, Werner P, Hsu A, Olanow CW, Perl DP: Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 149:21-28, 1996
73. Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G: Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17:2653-2657, 1997
74. MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA: Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11853-11858, 1996
75. Fukuyama N, Takebayashi Y, Hida M, Ishida H, Ichimori K, Nakazawa H: Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Radic Biol Med* 22:771-774, 1997
76. Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, Stenson WF: Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 111:871-885, 1996
77. Kaur H, Halliwell B: Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* 350:9-12, 1994
78. Ischiropoulos H: Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 356:1-11, 1998
79. Aoyama K, Matsubara K, Fujikawa Y, Nagahiro Y, Shimizu K, Umegae N, Hayase N, Shiono H, Kobayashi S: Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 47:524-527, 2000
80. Pignatelli B, Li CQ, Boffetta P, Chen Q, Ahrens W, Nyberg F, Mukeria A, Bruske-Hohlfeld I, Fortes C, Constantinescu V, Ischiropoulos H, Ohshima H: Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer Res* 61:778-784, 2001



81. Gole MD, Souza JM, Choi I, Hertkorn C, Malcolm S, Foust RF, III, Finkel B, Lanken PN, Ischiropoulos H: Plasma proteins modified by tyrosine nitration in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:L961-L967, 2000
82. Souza JM, Daikhin E, Yudkoff M, Raman CS, Ischiropoulos H: Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys* 371:169-178, 1999
83. Greenacre SA, Ischiropoulos H: Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res* 34:541-581, 2001
84. Sato E, Simpson KL, Grisham MB, Koyama S, Robbins RA: Reactive nitrogen and oxygen species attenuate interleukin- 8-induced neutrophil chemotactic activity in vitro. *J Biol Chem* 275:10826-10830, 2000
85. Gow AJ, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H: Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett* 385:63-66, 1996
86. Kamisaki Y, Wada K, Bian K, Balabanli B, Davis K, Martin E, Behbod F, Lee YC, Murad F: An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11584-11589, 1998
87. Sabetkar M, Low SY, Naseem KM, Bruckdorfer KR: The nitration of proteins in platelets: significance in platelet function. *Free Radic Biol Med* 33:728-736, 2002
88. Stadtman ER, Levine RL: Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25:207-218, 2003
89. Langer AK, Poon HF, Munch G, Lynn BC, Arendt T, Butterfield DA: Identification of AGE-modified proteins in SH-SY5Y and OLN-93 cells. *Neurotox Res* 9:255-268, 2006
90. Thorpe SR, Baynes JW: Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids* 25:275-281, 2003

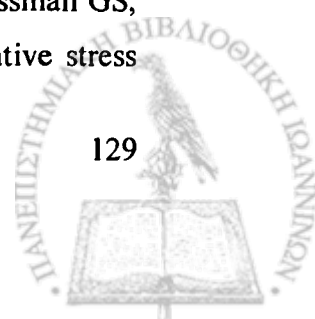


91. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329:23-38, 2003
92. Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele dS: Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications. *Kidney Int Suppl* 76:S120-S125, 2000
93. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324 ( Pt 1):1-18, 1997
94. Anderson MM, Hazen SL, Hsu FF, Heinecke JW: Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *J Clin Invest* 99:424-432, 1997
95. Miyata T, Ueda Y, Yamada Y, Izuhara Y, Wada T, Jadoul M, Saito A, Kurokawa K, van Ypersele dS: Accumulation of carbonyls accelerates the formation of pentosidine, an advanced glycation end product: carbonyl stress in uremia. *J Am Soc Nephrol* 9:2349-2356, 1998
96. Miyata T, van Ypersele dS, Kurokawa K, Baynes JW: Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int* 55:389-399, 1999
97. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER: Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464-478, 1990
98. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E: Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233:346-357, 1994
99. Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC: Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med* 23:361-366, 1997
100. Keller RJ, Halmes NC, Hinson JA, Pumford NR: Immunochemical detection of oxidized proteins. *Chem Res Toxicol* 6:430-433, 1993





101. Shacter E, Williams JA, Lim M, Levine RL: Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radic Biol Med* 17:429-437, 1994
102. Conrad CC, Marshall PL, Talent JM, Malakowsky CA, Choi J, Gracy RW: Oxidized proteins in Alzheimer's plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 275:678-681, 2000
103. Aksenov MY, Aksenova MV, Butterfield DA, Geddes JW, Markesbery WR: Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 103:373-383, 2001
104. Castegna A, Aksenov M, Aksenova M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booza R, Markesbery WR, Butterfield DA: Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med* 33:562-571, 2002
105. Floor E, Wetzel MG: Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J Neurochem* 70:268-275, 1998
106. Himmelfarb J, McMonagle E, McMennamin E: Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 58:2571-2578, 2000
107. Himmelfarb J, McMonagle E: Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int* 60:358-363, 2001
108. Ramsay PL, DeMayo FJ, Hegemier SE, Wearden ME, Smith CV, Welty SE: Clara cell secretory protein oxidation and expression in premature infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 164:155-161, 2001
109. Lenz AG, Jorens PG, Meyer B, De Backer W, Van Overveld F, Bossaert L, Maier KL: Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *Eur Respir J* 13:169-174, 1999
110. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, Weissman GS, Katz S, Floyd RA, McKinley MJ, Fisher SE, Mullin GE: Increased oxidative stress



and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 41:2078-2086, 1996

111. Mantle D, Falkous G, Walker D: Quantification of protease activities in synovial fluid from rheumatoid and osteoarthritis cases: comparison with antioxidant and free radical damage markers. *Clin Chim Acta* 284:45-58, 1999
112. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Gagliano N, Lusini L, Milzani A, Di Simplicio P, Colombo R: Actin carbonylation: from a simple marker of protein oxidation to relevant signs of severe functional impairment. *Free Radic Biol Med* 31:1075-1083, 2001
113. Milzani A, Rossi R, Di Simplicio P, Giustarini D, Colombo R, DalleDonne I: The oxidation produced by hydrogen peroxide on Ca-ATP-G-actin. *Protein Sci* 9:1774-1782, 2000
114. Shacter E, Williams JA, Levine RL: Oxidative modification of fibrinogen inhibits thrombin-catalyzed clot formation. *Free Radic Biol Med* 18:815-821, 1995
115. Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbita SP, Wu JF, Carney JM, .: Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem* 65:2146-2156, 1995
116. Butterfield DA, Hensley K, Cole P, Subramaniam R, Aksenov M, Aksenova M, Bummer PM, Haley BE, Carney JM: Oxidatively induced structural alteration of glutamine synthetase assessed by analysis of spin label incorporation kinetics: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68:2451-2457, 1997
117. Leeuwenburgh C, Rasmussen JE, Hsu FF, Mueller DM, Pennathur S, Heinecke JW: Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *J Biol Chem* 272:3520-3526, 1997



118. Hazell LJ, Arnold L, Flowers D, Waeg G, Malle E, Stocker R: Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 97:1535-1544, 1996
119. Prior RL, Cao G: In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 27:1173-1181, 1999
120. Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605, 1979
121. Meister A: Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1271:35-42, 1995
122. Gaetani GF, Kirkman HN, Mangerini R, Ferraris AM: Importance of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 84:325-330, 1994
123. Rhee SG, Kang SW, Netto LE, Seo MS, Stadtman ER: A family of novel peroxidases, peroxiredoxins. *Biofactors* 10:207-209, 1999
124. Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K: Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 52:35-41, 2001
125. Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB: 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem* 275:28421-28427, 2000
126. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ: Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 32:S112-S119, 1998
127. Baigent C, Burbury K, Wheeler D: Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet* 356:147-152, 2000
128. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM: The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 62:1524-1538, 2002

129. Rasu RS, Crawford T, Manley HJ, Balkrishnan R: Treatment of hypertension and diabetes mellitus in patients with chronic kidney disease: a review. *Expert Opin Pharmacother* 8:2543-2551, 2007
130. Wiederkehr M, Toto R, Fenves AZ, Ram CV: Hypertension and the kidney. *Semin Nephrol* 25:236-245, 2005
131. Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, Teehan BP, Levey AS: Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 58:353-362, 2000
132. Stenvinkel P, Pecoits-Filho R, Lindholm B: Coronary artery disease in end-stage renal disease: no longer a simple plumbing problem. *J Am Soc Nephrol* 14:1927-1939, 2003
133. Haugen E, Nath KA: The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. *Blood Purif* 17:58-65, 1999
134. Alfrey AC: Role of iron and oxygen radicals in the progression of chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 23:183-187, 1994
135. RONDONI P, CUDKOWICZ G: Hydrogen peroxide in tumours; its possible significance in carcinogenesis. *Experientia* 9:348-349, 1953
136. Guidet B, Shah SV: Enhanced in vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by rat kidney in glycerol-induced renal failure. *Am J Physiol* 257:F440-F445, 1989
137. Nath KA, Croatt AJ, Hostetter TH: Oxygen consumption and oxidant stress in surviving nephrons. *Am J Physiol* 258:F1354-F1362, 1990
138. Alfrey AC, Hammond WS: Renal iron handling in the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 37:1409-1413, 1990
139. Rutkowski P, Slominska EM, Szolkiewicz M, Aleksandrowicz E, Smolenski RT, Wolyniec W, Renke M, Wisterowicz K, Swierczynski J, Rutkowski B: Relationship between uremic toxins and oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Scand J Urol Nephrol* 41:243-248, 2007

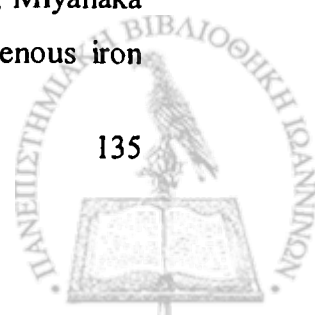


140. Dennis VW, Robinson K: Homocysteinemia and vascular disease in end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl* 57:S11-S17, 1996
141. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thevenin M, Jaudon MC, Zingraff J, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B: Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 21:845-853, 1996
142. Schiavon R, Guidi GC, Biasioli S, De Fanti E, Targa L: Plasma glutathione peroxidase activity as an index of renal function. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 32:759-765, 1994
143. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paultre F, Diczfalusy U, Wang T, Berglund L, Jøgestrand T: Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 55:1899-1911, 1999
144. Halliwell B, Gutteridge JM: The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280:1-8, 1990
145. Becker BN, Himmelfarb J, Henrich WL, Hakim RM: Reassessing the cardiac risk profile in chronic hemodialysis patients: a hypothesis on the role of oxidant stress and other non-traditional cardiac risk factors. *J Am Soc Nephrol* 8:475-486, 1997
146. Yoon JW, Pahl MV, Vaziri ND: Spontaneous leukocyte activation and oxygen-free radical generation in end-stage renal disease. *Kidney Int* 71:167-172, 2007
147. Bhaskaran M, Radhakrishnan N, Patni H, Singh P, Chaudhary AN, Singhal PC: Dialysis membrane-induced oxidative stress: role of heme oxygenase-1. *Nephron Exp Nephrol* 105:e24-e32, 2007
148. Galli F, Ronco C: Oxidant stress in hemodialysis. *Nephron* 84:1-5, 2000
149. Deicher R, Ziai F, Bieglmayer C, Schillinger M, Horl WH: Low total vitamin C plasma level is a risk factor for cardiovascular morbidity and mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 16:1811-1818, 2005

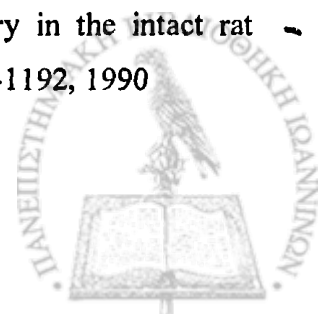
150. Deicher R, Horl WH: Vitamin C in chronic kidney disease and hemodialysis patients. *Kidney Blood Press Res* 26:100-106, 2003
151. Wang S, Eide TC, Sogn EM, Berg KJ, Sund RB: Plasma ascorbic acid in patients undergoing chronic haemodialysis. *Eur J Clin Pharmacol* 55:527-532, 1999
152. Wratten ML, Navino C, Tetta C, Verzetti G: Haemolipodialysis. *Blood Purif* 17:127-133, 1999
153. Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS: Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin Chem* 41:1135-1138, 1995
154. Zeier M, Schwenger V, Deppisch R, Haug U, Weigel K, Bahner U, Wanner C, Schneider H, Henle T, Ritz E: Glucose degradation products in PD fluids: do they disappear from the peritoneal cavity and enter the systemic circulation? *Kidney Int* 63:298-305, 2003
155. Martinson E, Wieslander A, Kjellstrand P, Boberg U: Toxicity of heat sterilized peritoneal dialysis fluids is derived from degradation of glucose. *ASAIO J* 38:M370-M372, 1992
156. Miyata T, Devuyst O, Kurokawa K, van Ypersele dS: Toward better dialysis compatibility: advances in the biochemistry and pathophysiology of the peritoneal membranes. *Kidney Int* 61:375-386, 2002
157. La Greca G, Amore A, Armato U, Coles G, Esposito C, Deppisch R, Feriani M, Mason R, Noonan D, Schleicher E, Sterzel B, Gambaro G: The un-physiology of peritoneal dialysis solution and the peritoneal membrane: from basic research to clinical nephrology. *Nephrol Dial Transplant* 16:905-912, 2001
158. Lee EJ, Myint CC, Tay ME, Yusuf N, Ong CN: Serum ascorbic acid and protein calorie malnutrition in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial* 17:219-222, 2001



159. Lim SL, Lee EJ, Myint CC, Ong KT, Tay ME, Yusuf N, Ong CN: Oral intake and serum levels of ascorbic acid in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial* 17:215-218, 2001
160. Tsapas G, Magoula I, Paletas K, Concouris L: Effect of peritoneal dialysis on plasma levels of ascorbic acid. *Nephron* 33:34-37, 1983
161. Heaf JG, Sarac S, Afzal S: A high peritoneal large pore fluid flux causes hypoalbuminaemia and is a risk factor for death in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 20:2194-2201, 2005
162. Morgan HE, Holt RC, Jones CA, Judd BA: Intravenous iron treatment in paediatric chronic kidney disease patients not on erythropoietin. *Pediatr Nephrol* 22:1963-1965, 2007
163. Zager RA: Intravenous iron therapy in peritoneal dialysis patients: short-term efficacy and long-term issues. *Clin J Am Soc Nephrol* 1:353-355, 2006
164. Lim PS, Wei YH, Yu YL, Kho B: Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. *Nephrol Dial Transplant* 14:2680-2687, 1999
165. Drueke T, Witko-Sarsat V, Massy Z, Descamps-Latscha B, Guerin AP, Marchais SJ, Gausson V, London GM: Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. *Circulation* 106:2212-2217, 2002
166. Hodkova M, Dusilova-Sulkova S, Skalicka A, Kalousova M, Zima T, Bartunkova J: Influence of parenteral iron therapy and oral vitamin E supplementation on neutrophil respiratory burst in chronic hemodialysis patients. *Ren Fail* 27:135-141, 2005
167. Mimic-Oka J, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Opacic M, Simic T, Dimkovic N, Simic DV: Evaluation of oxidative stress after repeated intravenous iron supplementation. *Ren Fail* 27:345-351, 2005
168. Anraku M, Kitamura K, Shinohara A, Adachi M, Suenga A, Maruyama T, Miyanaka K, Miyoshi T, Shiraishi N, Nonoguchi H, Otagiri M, Tomita K: Intravenous iron



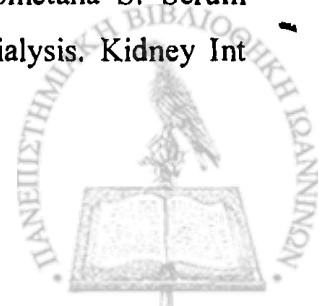
- administration induces oxidation of serum albumin in hemodialysis patients. *Kidney Int* 66:841-848, 2004
169. Tovbin D, Mazor D, Vorobiov M, Chaimovitz C, Meyerstein N: Induction of protein oxidation by intravenous iron in hemodialysis patients: role of inflammation. *Am J Kidney Dis* 40:1005-1012, 2002
170. Himmelfarb J, Hakim RM: Oxidative stress in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12:593-598, 2003
171. Rossert J, McClellan WM, Roger SD, Verbeelen DL: Epoetin treatment: what are the arguments to expect a beneficial effect on renal disease progression? *Nephrol Dial Transplant* 17:359-362, 2002
172. Siems W, Carluccio F, Radenkovic S, Grune T, Hampl H: Oxidative stress in renal anemia of hemodialysis patients is mitigated by epoetin treatment. *Kidney Blood Press Res* 28:295-301, 2005
173. Gouva C, Nikolopoulos P, Ioannidis JP, Siamopoulos KC: Treating anemia early in renal failure patients slows the decline of renal function: a randomized controlled trial. *Kidney Int* 66:753-760, 2004
174. Marsillach J, Martinez-Vea A, Marcas L, Mackness B, Mackness M, Ferre N, Joven J, Camps J: Administration of exogenous erythropoietin beta affects lipid peroxidation and serum paraoxonase-1 activity and concentration in predialysis patients with chronic renal disease and anaemia. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:347-349, 2007
175. Katavetin P, Tungsanga K, Eiam-Ong S, Nangaku M: Antioxidative effects of erythropoietin. *Kidney Int Suppl* S10-S15, 2007
176. Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG, Oubina P, Cachofeiro V, Gomez-Campdera F, Amann R, Luno J: Oxidative stress in uremia: the role of anemia correction. *J Am Soc Nephrol* 17:S174-S177, 2006
177. Nath KA, Salahudeen AK: Induction of renal growth and injury in the intact rat kidney by dietary deficiency of antioxidants. *J Clin Invest* 86:1179-1192, 1990





178. Nath KA, Enright H, Nutter L, Fischereder M, Zou JN, Hebbel RP: Effect of pyruvate on oxidant injury to isolated and cellular DNA. *Kidney Int* 45:166-176, 1994
179. Schwochau GB, Nath KA, Rosenberg ME: Clusterin protects against oxidative stress in vitro through aggregative and nonaggregative properties. *Kidney Int* 53:1647-1653, 1998
180. Katusic ZS: Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radic Biol Med* 20:443-448, 1996
181. Remuzzi G, Zoja C, Bertani T: Glomerulonephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2:465-474, 1993
182. Shah SV: The role of reactive oxygen metabolites in glomerular disease. *Annu Rev Physiol* 57:245-262, 1995
183. Yoshioka T, Ichikawa I, Fogo A: Reactive oxygen metabolites cause massive, reversible proteinuria and glomerular sieving defect without apparent ultrastructural abnormality. *J Am Soc Nephrol* 2:902-912, 1991
184. Gailit J, Colflesh D, Rabiner I, Simone J, Goligorsky MS: Redistribution and dysfunction of integrins in cultured renal epithelial cells exposed to oxidative stress. *Am J Physiol* 264:F149-F157, 1993
185. Neale TJ, Ojha PP, Exner M, Poczewski H, Ruger B, Witztum JL, Davis P, Kerjaschki D: Proteinuria in passive Heymann nephritis is associated with lipid peroxidation and formation of adducts on type IV collagen. *J Clin Invest* 94:1577-1584, 1994
186. Abbate M, Zoja C, Remuzzi G: How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol* 17:2974-2984, 2006
187. Sen CK, Packer L: Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 10:709-720, 1996
188. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A: Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 22:269-285, 1997

189. Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, Yamasaki Y, Ota A: Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int* 49:103-111, 1996
190. Lieberthal W, Levine JS: Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 271:F477-F488, 1996
191. Brady HR: Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney Int* 45:1285-1300, 1994
192. Schena FP, Gesualdo L, Grandaliano G, Montinaro V: Progression of renal damage in human glomerulonephritides: is there sleight of hand in winning the game? *Kidney Int* 52:1439-1457, 1997
193. Conner EM, Grisham MB: Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 12:274-277, 1996
194. Himmelfarb J: Relevance of oxidative pathways in the pathophysiology of chronic kidney disease. *Cardiol Clin* 23:319-330, 2005
195. Fiorillo C, Oliviero C, Rizzuti G, Nediani C, Pacini A, Nassi P: Oxidative stress and antioxidant defenses in renal patients receiving regular haemodialysis. *Clin Chem Lab Med* 36:149-153, 1998
196. Martin-Mateo MC, Sanchez-Portugal M, Iglesias S, de Paula A, Bustamante J: Oxidative stress in chronic renal failure. *Ren Fail* 21:155-167, 1999
197. Usberti M, Gerardi GM, Gazzotti RM, Benedini S, Archetti S, Sugherini L, Valentini M, Tira P, Bufano G, Albertini A, Di Lorenzo D: Oxidative stress and cardiovascular disease in dialyzed patients. *Nephron* 91:25-33, 2002
198. Boaz M, Matas Z, Biro A, Katzir Z, Green M, Fainaru M, Smetana S: Comparison of hemostatic factors and serum malondialdehyde as predictive factors for cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 34:438-444, 1999
199. Boaz M, Matas Z, Biro A, Katzir Z, Green M, Fainaru M, Smetana S: Serum malondialdehyde and prevalent cardiovascular disease in hemodialysis. *Kidney Int* 56:1078-1083, 1999



- 200.- Siems W, Carluccio F, Grune T, Jakstadt M, Quast S, Hampl H, Sommerburg O: Elevated serum concentration of cardiotoxic lipid peroxidation products in chronic renal failure in relation to severity of renal anemia. *Clin Nephrol* 58 Suppl 1:S20-S25, 2002
201. Prakash M, Upadhya S, Prabhu R: Protein thiol oxidation and lipid peroxidation in patients with uraemia. *Scand J Clin Lab Invest* 64:599-604, 2004
202. Dursun B, Dursun E, Capraz I, Ozben T, Apaydin A, Suleymanlar G: Are uremia, diabetes, and atherosclerosis linked with impaired antioxidant mechanisms? *J Investig Med* 56:545-552, 2008
203. Karamouzis I, Sarafidis PA, Karamouzis M, Iliadis S, Haidich AB, Sioulis A, Triantos A, Vavatsi-Christaki N, Grekas DM: Increase in oxidative stress but not in antioxidant capacity with advancing stages of chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 28:397-404, 2008
204. Handelman GJ, Walter MF, Adhikarla R, Gross J, Dallal GE, Levin NW, Blumberg JB: Elevated plasma F2-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. *Kidney Int* 59:1960-1966, 2001
205. Ikizler TA, Morrow JD, Roberts LJ, Evanson JA, Becker B, Hakim RM, Shyr Y, Himmelfarb J: Plasma F2-isoprostane levels are elevated in chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 58:190-197, 2002
206. Lim PS, Chang YM, Thien LM, Wang NP, Yang CC, Chen TT, Hsu WM: 8-isoprostaglandin F2alpha as a useful clinical biomarker of oxidative stress in ESRD patients. *Blood Purif* 20:537-542, 2002
207. Wiswedel I, Hirsch D, Carluccio F, Hampl H, Siems W: F2-isoprostanes as biomarkers of lipid peroxidation in patients with chronic renal failure. *Biofactors* 24:201-208, 2005
208. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, Himmelfarb J: Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int* 65:1009-1016, 2004



209. Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K, Katopodis KP, Tselepis A, Siamopoulos KC, Tsakiris D: Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *Am J Kidney Dis* 48:752-760, 2006
210. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ: A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9383-9387, 1990
211. Bossola M, Tazza L, Merki E, Giungi S, Luciani G, Miller ER, Lin EB, Tortorelli A, Tsimikas S: Oxidized low-density lipoprotein biomarkers in patients with end-stage renal failure: acute effects of hemodialysis. *Blood Purif* 25:457-465, 2007
212. Salomon RG, Kaur K, Podrez E, Hoff HF, Krushinsky AV, Sayre LM: HNE-derived 2-pentylpyrroles are generated during oxidation of LDL, are more prevalent in blood plasma from patients with renal disease or atherosclerosis, and are present in atherosclerotic plaques. *Chem Res Toxicol* 13:557-564, 2000
213. Ziouzenkova O, Asatryan L, Akmal M, Tetta C, Wratten ML, Loseto-Wich G, Jurgens G, Heinecke J, Sevanian A: Oxidative cross-linking of ApoB100 and hemoglobin results in low density lipoprotein modification in blood. Relevance to atherogenesis caused by hemodialysis. *J Biol Chem* 274:18916-18924, 1999
214. Himmelfarb J, McMenamin ME, Loseto G, Heinecke JW: Myeloperoxidase-catalyzed 3-chlorotyrosine formation in dialysis patients. *Free Radic Biol Med* 31:1163-1169, 2001
215. Himmelfarb J, McMonagle E: Manifestations of oxidant stress in uremia. *Blood Purif* 19:200-205, 2001
216. Dursun E, Dursun B, Suleymanlar G, Ozben T: Carbonyl stress in chronic renal failure: the effect of haemodialysis. *Ann Clin Biochem* 42:64-66, 2005
217. Mera K, Anraku M, Kitamura K, Nakajou K, Maruyama T, Tomita K, Otagiri M: Oxidation and carboxy methyl lysine-modification of albumin: possible involvement



- in the progression of oxidative stress in hemodialysis patients. *Hypertens Res* 28:973-980, 2005
218. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G: AGEs and carbonyl stress: potential pathogenetic factors of long-term uraemic complications. *Nephrol Dial Transplant* 15 Suppl 2:7-11, 2000
219. Kalousova M, Zima T, Tesar V, Lachmanova J: Advanced glycation end products and advanced oxidation protein products in hemodialyzed patients. *Blood Purif* 20:531-536, 2002
220. Kalousova M, Sulkova S, Fialova L, Soukupova J, Malbohan IM, Spacek P, Braun M, Mikulikova L, Fortova M, Horejsi M, Tesar V, Zima T: Glycooxidation and inflammation in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 18:2577-2581, 2003
221. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen KT, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drueke T, Descamps-Latscha B: Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 161:2524-2532, 1998
222. Rodriguez-Ayala E, Anderstam B, Suliman ME, Seeberger A, Heimbürger O, Lindholm B, Stenvinkel P: Enhanced RAGE-mediated NFκB stimulation in inflamed hemodialysis patients. *Atherosclerosis* 180:333-340, 2005
223. Coskun C, Kural A, Doventas Y, Koldas M, Ozturk H, Inal BB, Gumus A: Hemodialysis and protein oxidation products. *Ann N Y Acad Sci* 1100:404-408, 2007
224. Wada T, Miyata T, Kurokawa K: Implication of carbonyl stress in long-term uraemic complications. *Nephrol Dial Transplant* 14 Suppl 1:79-81, 1999
225. Floridi A, Antolini F, Galli F, Fagugli RM, Floridi E, Buoncrisiani U: Daily haemodialysis improves indices of protein glycation. *Nephrol Dial Transplant* 17:871-878, 2002

226. Miyata T, Sugiyama S, Saito A, Kurokawa K: Reactive carbonyl compounds related uremic toxicity ("carbonyl stress"). *Kidney Int Suppl* 78:S25-S31, 2001
227. Miyata T, Kurokawa K, Van Ypersele DS: Advanced glycation and lipoxidation end products: role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *J Am Soc Nephrol* 11:1744-1752, 2000
228. Boulanger E, Moranne O, Wautier MP, Witko-Sarsat V, Descamps-Latscha B, Kandoussi A, Grossin N, Wautier JL: Changes in glycation and oxidation markers in patients starting peritoneal dialysis: a pilot study. *Perit Dial Int* 26:207-212, 2006
229. Rutkowski P, Malgorzewicz S, Slominska E, Renke M, Lysiak-Szydłowska W, Swierczynski J, Rutkowski B: Interrelationship between uremic toxicity and oxidative stress. *J Ren Nutr* 16:190-193, 2006
230. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, Witko-Sarsat V, Thevenin M, Touam M, Lambrey G, Lacour B, Druke TB, Descamps-Latscha B: Critical evaluation of plasma and LDL oxidant-trapping potential in hemodialysis patients. *Kidney Int* 56:747-753, 1999
231. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B: Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 49:1304-1313, 1996
232. Witko-Sarsat V, Gausson V, Descamps-Latscha B: Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney Int Suppl* S11-S14, 2003
233. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V: Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int Suppl* 78:S108-S113, 2001
234. Soriani M, Pietraforte D, Minetti M: Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Arch Biochem Biophys* 312:180-188, 1994
235. Mera K, Anraku M, Kitamura K, Nakajou K, Maruyama T, Otagiri M: The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: Its role in elevated



- oxidative stress via neutrophil burst. *Biochem Biophys Res Commun* 334:1322-1328, 2005
236. Terawaki H, Yoshimura K, Hasegawa T, Matsuyama Y, Negawa T, Yamada K, Matsushima M, Nakayama M, Hosoya T, Era S: Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. *Kidney Int* 66:1988-1993, 2004
237. Nieto FJ, Iribarren C, Gross MD, Comstock GW, Cutler RG: Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis* 148:131-139, 2000
238. Clermont G, Lecour S, Lahet J, Siohan P, Vergely C, Chevet D, Rifle G, Rochette L: Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. *Cardiovasc Res* 47:618-623, 2000
239. Mimic-Oka J, Simic T, Djukanovic L, Reljic Z, Davicevic Z: Alteration in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure. *Clin Nephrol* 51:233-241, 1999
240. Dursun E, Ozben T, Suleymanlar G, Dursun B, Yakupoglu G: Effect of hemodialysis on the oxidative stress and antioxidants. *Clin Chem Lab Med* 40:1009-1013, 2002
241. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C: Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 18:1272-1280, 2003
242. Rohrdanz E, Kahl R: Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 24:27-38, 1998
243. Martin-Mateo MC, Canto-Jafiez E, Barrero-Martinez MJ: Oxidative stress and enzyme activity in ambulatory renal patients undergoing continuous peritoneal dialysis. *Ren Fail* 20:117-124, 1998

244. Mimic-Oka J, Simic T, Ekmescic V, Dragicevic P: Erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in different stages of chronic renal failure. *Clin Nephrol* 44:44-48, 1995
245. Zwolinska D, Grzeszczak W, Szczepanska M, Kilis-Pstrusinska K, Szprynger K: Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in children on maintenance dialysis. *Pediatr Nephrol* 21:705-710, 2006
246. Handelman GJ: Vitamin C deficiency in dialysis patients--are we perceiving the tip of an iceberg? *Nephrol Dial Transplant* 22:328-331, 2007
247. Zwolinska D, Grzeszczak W, Szczepanska M, Kilis-Pstrusinska K, Szprynger K: Vitamins A, E and C as non-enzymatic antioxidants and their relation to lipid peroxidation in children with chronic renal failure. *Nephron Clin Pract* 103:c12-c18, 2006
248. Hultqvist M, Hegbrant J, Nilsson-Thorell C, Lindholm T, Nilsson P, Linden T, Hultqvist-Bengtsson U: Plasma concentrations of vitamin C, vitamin E and/or malondialdehyde as markers of oxygen free radical production during hemodialysis. *Clin Nephrol* 47:37-46, 1997
249. Galli F, Varga Z, Balla J, Ferraro B, Canestrari F, Floridi A, Kakuk G, Buoncristiani U: Vitamin E, lipid profile, and peroxidation in hemodialysis patients. *Kidney Int Suppl* 78:S148-S154, 2001
250. Galli F, Floridi AG, Floridi A, Buoncristiani U: Accumulation of vitamin E metabolites in the blood of renal failure patients. *Clin Nutr* 23:205-212, 2004
251. Massy ZA, Borderie D, Nguyen-Khoa T, Druke TB, Ekindjian OG, Lacour B: Increased plasma S-nitrosothiol levels in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 18:153-157, 2003
252. Locatelli F, Bommer J, London GM, Martin-Malo A, Wanner C, Yaqoob M, Zoccali C: Cardiovascular disease determinants in chronic renal failure: clinical approach and treatment. *Nephrol Dial Transplant* 16:459-468, 2001





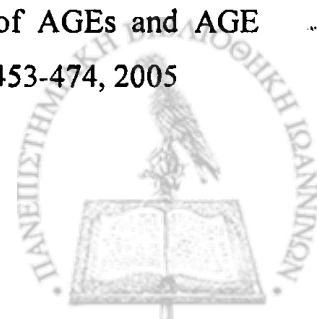
253. Dirican M, Sarandol E, Serdar Z, Ocak N, Dilek K: Oxidative status and prevalent cardiovascular disease in patients with chronic renal failure treated by hemodialysis. *Clin Nephrol* 68:144-150, 2007
254. Kaisar M, Isbel N, Johnson DW: Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. A clinical review. *Minerva Urol Nefrol* 59:281-297, 2007
255. Wratten ML, Galaris D, Tetta C, Sevanian A: Evolution of oxidative stress and inflammation during hemodialysis and their contribution to cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal* 4:935-944, 2002
256. Yao Q, Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P: Traditional and non-traditional risk factors as contributors to atherosclerotic cardiovascular disease in end-stage renal disease. *Scand J Urol Nephrol* 38:405-416, 2004
257. Tomiyama C, Higa A, Dalboni MA, Cendoroglo M, Draibe SA, Cuppari L, Carvalho AB, Neto EM, Canziani ME: The impact of traditional and non-traditional risk factors on coronary calcification in pre-dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 21:2464-2471, 2006
258. Himmelfarb J: Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg? *Semin Dial* 17:449-454, 2004
259. Kaysen GA: The microinflammatory state in uremia: causes and potential consequences. *J Am Soc Nephrol* 12:1549-1557, 2001
260. Jofre R, Rodriguez-Benitez P, Lopez-Gomez JM, Perez-Garcia R: Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 17:S274-S280, 2006
261. Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, Furberg CD, Psaty BM: Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation* 107:87-92, 2003
262. Morena M, Delbosc S, Dupuy AM, Canaud B, Cristol JP: Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodial Int* 9:37-46, 2005

263. Arici M, Walls J: End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: is C-reactive protein the missing link? *Kidney Int* 59:407-414, 2001
264. Hutchinson WL, Koenig W, Frohlich M, Sund M, Lowe GD, Pepys MB: Immunoradiometric assay of circulating C-reactive protein: age-related values in the adult general population. *Clin Chem* 46:934-938, 2000
265. Memoli B: Cytokine production in haemodialysis. *Blood Purif* 17:149-158, 1999
266. Dinarello CA, Lonnemann G, Bingel M, Koch KM, Shaldon S: Biological consequences of monocyte activation during hemodialysis. *Contrib Nephrol* 59:1-9, 1987
267. Canaud B, Bosc JY, Leray H, Morena M, Stec F: Microbiologic purity of dialysate: rationale and technical aspects. *Blood Purif* 18:200-213, 2000
268. Pereira BJ, Snodgrass BR, Hogan PJ, King AJ: Diffusive and convective transfer of cytokine-inducing bacterial products across hemodialysis membranes. *Kidney Int* 47:603-610, 1995
269. Kumano K, Yokota S, Nanbu M, Sakai T: Do cytokine-inducing substances penetrate through dialysis membranes and stimulate monocytes? *Kidney Int Suppl* 41:S205-S208, 1993
270. Lonnemann G: The quality of dialysate: an integrated approach. *Kidney Int Suppl* 76:S112-S119, 2000
271. Panichi V, Migliori M, De Pietro S, Taccola D, Bianchi AM, Norpoth M, Metelli MR, Giovannini L, Tetta C, Palla R: C reactive protein in patients with chronic renal diseases. *Ren Fail* 23:551-562, 2001
272. Stenvinkel P, Alvestrand A: Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy. *Semin Dial* 15:329-337, 2002
273. Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergström J: Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between

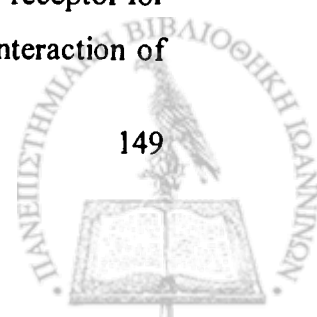


- malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant* 15:953-960, 2000
274. Jeznach-Steinhagen A, Slotwinski R, Szczygiel B: Malnutrition, inflammation, atherosclerosis in hemodialysis patients. *Rocz Panstw Zakl Hig* 58:83-88, 2007
275. Miyata T, Inagi R, Kurokawa K: Diagnosis, pathogenesis, and treatment of dialysis-related amyloidosis. *Miner Electrolyte Metab* 25:114-117, 1999
276. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP, Kebede M, Salama L, Lambrey G, Witko-Sarsat V, Druke TB, Lacour B, Thevenin M: Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 16:335-340, 2001
277. Bhaskaran M, Radhakrishnan N, Patni H, Singh P, Chaudhary AN, Singhal PC: Dialysis membrane-induced oxidative stress: role of heme oxygenase-1. *Nephron Exp Nephrol* 105:e24-e32, 2007
278. Spittle MA, Hoenich NA, Handelman GJ, Adhikarla R, Homel P, Levin NW: Oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 38:1408-1413, 2001
279. Danielski M, Ikizler TA, McMonagle E, Kane JC, Pupim L, Morrow J, Himmelfarb J: Linkage of hypoalbuminemia, inflammation, and oxidative stress in patients receiving maintenance hemodialysis therapy. *Am J Kidney Dis* 42:286-294, 2003
280. Descamps-Latscha B, Jungers P, Witko-Sarsat V: Immune system dysregulation in uremia: role of oxidative stress. *Blood Purif* 20:481-484, 2002
281. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126, 1999
282. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320:915-924, 1989
283. Lusis AJ: Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241, 2000

284. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ: Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 91:2488-2496, 1995
285. Uchida K, Itakura K, Kawakishi S, Hiai H, Toyokuni S, Stadtman ER: Characterization of epitopes recognized by 4-hydroxy-2-nonenal specific antibodies. *Arch Biochem Biophys* 324:241-248, 1995
286. Taki K, Takayama F, Tsuruta Y, Niwa T: Oxidative stress, advanced glycation end product, and coronary artery calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int* 70:218-224, 2006
287. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Gausson V, Mothu N, London GM, Jungers P: Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. *Am J Kidney Dis* 45:39-47, 2005
288. Wagner Z, Molnar M, Molnar GA, Tamasko M, Laczy B, Wagner L, Csiky B, Heidland A, Nagy J, Wittmann I: Serum carboxymethyllysine predicts mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 47:294-300, 2006
289. Stein G, Busch M, Muller A, Wendt T, Franke C, Niwa T, Franke S: Are advanced glycation end products cardiovascular risk factors in patients with CRF? *Am J Kidney Dis* 41:S52-S56, 2003
290. Busch M, Franke S, Muller A, Wolf M, Gerth J, Ott U, Niwa T, Stein G: Potential cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: AGEs, total homocysteine and metabolites, and the C-reactive protein. *Kidney Int* 66:338-347, 2004
291. Miyata T, Inagi R, Asahi K, Yamada Y, Horie K, Sakai H, Uchida K, Kurokawa K: Generation of protein carbonyls by glycooxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 437:24-28, 1998
292. Thomas MC, Baynes JW, Thorpe SR, Cooper ME: The role of AGEs and AGE inhibitors in diabetic cardiovascular disease. *Curr Drug Targets* 6:453-474, 2005



293. van Ypersele dS: Advanced glycation in uraemic toxicity. *EDTNA ERCA J* 29:148-150, 2003
294. Kitauchi T, Yoshida K, Yoneda T, Saka T, Yoshikawa M, Ozono S, Hirao Y: Association between pentosidine and arteriosclerosis in patients receiving hemodialysis. *Clin Exp Nephrol* 8:48-53, 2004
295. Sakata N, Imanaga Y, Meng J, Tachikawa Y, Takebayashi S, Nagai R, Horiuchi S: Increased advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis* 142:67-77, 1999
296. Kalousova M, Hodkova M, Kazderova M, Fialova J, Tesar V, Dusilova-Sulkova S, Zima T: Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *Am J Kidney Dis* 47:406-411, 2006
297. Bucala R, Mitchell R, Arnold K, Innerarity T, Vlassara H, Cerami A: Identification of the major site of apolipoprotein B modification by advanced glycosylation end products blocking uptake by the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 270:10828-10832, 1995
298. Koch KM: Dialysis-related amyloidosis. *Kidney Int* 41:1416-1429, 1992
299. Ogawa H, Saito A, Oda O, Nakajima M, Chung TG: Detection of novel beta 2-microglobulin in the serum of hemodialysis patients and its amyloidogenic predisposition. *Clin Nephrol* 30:158-163, 1988
300. Odani H, Oyama R, Titani K, Ogawa H, Saito A: Purification and complete amino acid sequence of novel beta 2-microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 168:1223-1229, 1990
301. Miyata T, Inagi R, Wada Y, Ueda Y, Iida Y, Takahashi M, Taniguchi N, Maeda K: Glycation of human beta 2-microglobulin in patients with hemodialysis-associated amyloidosis: identification of the glycated sites. *Biochemistry* 33:12215-12221, 1994
302. Miyata T, Hori O, Zhang J, Yan SD, Ferran L, Iida Y, Schmidt AM: The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a central mediator of the interaction of



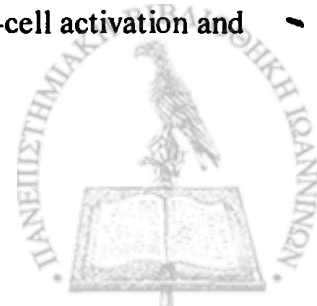
- AGE-beta2microglobulin with human mononuclear phagocytes via an oxidant-sensitive pathway. Implications for the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis. *J Clin Invest* 98:1088-1094, 1996
303. Miyata T, Oda O, Inagi R, Iida Y, Araki N, Yamada N, Horiuchi S, Taniguchi N, Maeda K, Kinoshita T: beta 2-Microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis. *J Clin Invest* 92:1243-1252, 1993
304. Miyata T, Taneda S, Kawai R, Ueda Y, Horiuchi S, Hara M, Maeda K, Monnier VM: Identification of pentosidine as a native structure for advanced glycation end products in beta-2-microglobulin-containing amyloid fibrils in patients with dialysis-related amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2353-2358, 1996
305. Niwa T, Miyazaki S, Katsuzaki T, Tatemichi N, Takei Y, Miyazaki T, Morita T, Hirasawa Y: Immunohistochemical detection of advanced glycation end products in dialysis-related amyloidosis. *Kidney Int* 48:771-778, 1995
306. Traut M, Haufe CC, Eismann U, Deppisch RM, Stein G, Wolf G: Increased binding of beta-2-microglobulin to blood cells in dialysis patients treated with high-flux dialyzers compared with low-flux membranes contributed to reduced beta-2-microglobulin concentrations. Results of a cross-over study. *Blood Purif* 25:432-440, 2007
307. Luciak M: Antioxidants in the treatment of patients with renal failure. *Rocz Akad Med Bialymst* 49:157-161, 2004
308. Schouten WE, Grooteman MP, van Houte AJ, Schoorl M, van Limbeek J, Nube MJ: Effects of dialyser and dialysate on the acute phase reaction in clinical bicarbonate dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 15:379-384, 2000
309. Chu PL, Chiu YL, Lin JW, Chen SI, Wu KD: Effects of low- and high-flux dialyzers on oxidative stress and insulin resistance. *Blood Purif* 26:213-220, 2008
310. Ward RA, Ouseph R, McLeish KR: Effects of high-flux hemodialysis on oxidant stress. *Kidney Int* 63:353-359, 2003



311. Wanner C, Bahner U, Mattern R, Lang D, Passlick-Deetjen J: Effect of dialysis flux and membrane material on dyslipidaemia and inflammation in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 19:2570-2575, 2004
312. Abdel-Naeem NM, Kandell NF, El Shamaa AA, Harba TM, Abdel-Hady AA: Biocompatible dialysis membranes and oxidative stress in patients with end-stage renal disease on maintenance haemodialysis. *J Egypt Soc Parasitol* 35:1173-1197, 2005
313. Furuya R, Kumagai H, Takahashi M, Sano K, Hishida A: Ultrapure dialysate reduces plasma levels of beta2-microglobulin and pentosidine in hemodialysis patients. *Blood Purif* 23:311-316, 2005
314. Izuhara Y, Miyata T, Saito K, Ishikawa N, Kakuta T, Nangaku M, Yoshida H, Saito A, Kurokawa K, van Ypersele dS: Ultrapure dialysate decreases plasma pentosidine, a marker of "carbonyl stress". *Am J Kidney Dis* 43:1024-1029, 2004
315. Huang KC, Yang CC, Hsu SP, Lee KT, Liu HW, Morisawa S, Otsubo K, Chien CT: Electrolyzed-reduced water reduced hemodialysis-induced erythrocyte impairment in end-stage renal disease patients. *Kidney Int* 70:391-398, 2006
316. Wratten ML, Sereni L, Tetta C: Hemolipodialysis attenuates oxidative stress and removes hydrophobic toxins. *Artif Organs* 24:685-690, 2000
317. Ziouzenkova O, Asatryan L, Tetta C, Wratten ML, Hwang J, Sevanian A: Oxidative stress during ex vivo hemodialysis of blood is decreased by a novel hemolipodialysis procedure utilizing antioxidants. *Free Radic Biol Med* 33:248-258, 2002
318. Usberti M, Gerardi G, Micheli A, Tira P, Bufano G, Gaggia P, Movilli E, Cancarini GC, De Marinis S, D'Avolio G, Broccoli R, Manganoni A, Albertin A, Di Lorenzo D: Effects of a vitamin E-bonded membrane and of glutathione on anemia and erythropoietin requirements in hemodialysis patients. *J Nephrol* 15:558-564, 2002
319. Kobayashi S, Moriya H, Aso K, Ohtake T: Vitamin E-bonded hemodialyzer improves atherosclerosis associated with a rheological improvement of circulating red blood cells. *Kidney Int* 63:1881-1887, 2003



320. Yang CC, Hsu SP, Wu MS, Hsu SM, Chien CT: Effects of vitamin C infusion and vitamin E-coated membrane on hemodialysis-induced oxidative stress. *Kidney Int* 69:706-714, 2006
321. Satoh M, Yamasaki Y, Nagake Y, Kasahara J, Hashimoto M, Nakanishi N, Makino H: Oxidative stress is reduced by the long-term use of vitamin E-coated dialysis filters. *Kidney Int* 59:1943-1950, 2001
322. Morimoto H, Nakao K, Fukuoka K, Sarai A, Yano A, Kihara T, Fukuda S, Wada J, Makino H: Long-term use of vitamin E-coated polysulfone membrane reduces oxidative stress markers in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 20:2775-2782, 2005
323. Sasaki M: Development of vitamin E-modified polysulfone membrane dialyzers. *J Artif Organs* 9:50-60, 2006
324. Mydlik M, Derzsiova K, Racz O, Sipulova A, Lovasova E, Molcanyiova A, Petrovicova J: Vitamin E-coated dialyzer and antioxidant defense parameters: three-month study. *Semin Nephrol* 24:525-531, 2004
325. Tarng DC, Huang TP, Liu TY, Chen HW, Sung YJ, Wei YH: Effect of vitamin E-bonded membrane on the 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine level in leukocyte DNA of hemodialysis patients. *Kidney Int* 58:790-799, 2000
326. Miyazaki H, Matsuoka H, Itabe H, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T: Hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress: effects of vitamin E-coated dialyzer. *Circulation* 101:1002-1006, 2000
327. Tsuruoka S, Kawaguchi A, Nishiki K, Hayasaka T, Fukushima C, Sugimoto K, Saito T, Fujimura A: Vitamin E-bonded hemodialyzer improves neutrophil function and oxidative stress in patients with end-stage renal failure. *Am J Kidney Dis* 39:127-133, 2002
328. Girndt M, Lengler S, Kaul H, Sester U, Sester M, Kohler H: Prospective crossover trial of the influence of vitamin E-coated dialyzer membranes on T-cell activation and cytokine induction. *Am J Kidney Dis* 35:95-104, 2000





329. Fumeron C, Nguyen-Khoa T, Saltiel C, Kebede M, Buisson C, Drueke TB, Lacour B, Massy ZA: Effects of oral vitamin C supplementation on oxidative stress and inflammation status in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 20:1874-1879, 2005
330. Tarng DC, Liu TY, Huang TP: Protective effect of vitamin C on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level in peripheral blood lymphocytes of chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 66:820-831, 2004
331. Tarng DC, Wei YH, Huang TP, Kuo BI, Yang WC: Intravenous ascorbic acid as an adjuvant therapy for recombinant erythropoietin in hemodialysis patients with hyperferritinemia. *Kidney Int* 55:2477-2486, 1999
332. Keven K, Kutlay S, Nergizoglu G, Erturk S: Randomized, crossover study of the effect of vitamin C on EPO response in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 41:1233-1239, 2003
333. Halliwell B: Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res* 25:57-74, 1996
334. Herbert V, Shaw S, Jayatilleke E: Vitamin C-driven free radical generation from iron. *J Nutr* 126:1213S-1220S, 1996
335. Buettner GR, Jurkiewicz BA: Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res* 145:532-541, 1996
336. Canavese C, Petrarulo M, Massarenti P, Berutti S, Fenoglio R, Pauletto D, Lanfranco G, Bergamo D, Sandri L, Marangella M: Long-term, low-dose, intravenous vitamin C leads to plasma calcium oxalate supersaturation in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 45:540-549, 2005
337. Handelman GJ: Vitamin C neglect in hemodialysis: sailing between Scylla and Charybdis. *Blood Purif* 25:58-61, 2007

338. Cristol JP, Bosc JY, Badiou S, Leblanc M, Lorrho R, Descomps B, Canaud B: Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation. *Nephrol Dial Transplant* 12:2312-2317, 1997
339. Islam KN, O'Byrne D, Devaraj S, Palmer B, Grundy SM, Jialal I: Alpha-tocopherol supplementation decreases the oxidative susceptibility of LDL in renal failure patients on dialysis therapy. *Atherosclerosis* 150:217-224, 2000
340. Giardini O, Taccone-Gallucci M, Lubrano R, Ricciardi-Tenore G, Bandino D, Silvi I, Paradisi C, Mannarino O, Citti G, Elli M, .: Effects of alpha-tocopherol administration on red blood cell membrane lipid peroxidation in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 21:174-177, 1984
341. Ono K: Effects of large dose vitamin E supplementation on anemia in hemodialysis patients. *Nephron* 40:440-445, 1985
342. Yukawa S, Hibino A, Maeda T, Mimura K, Yukawa A, Maeda A, Kishino M, Sonobe M, Mune M, Yamada Y, .: Effect of alpha-tocopherol on in vitro and in vivo metabolism of low-density lipoproteins in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 10 Suppl 3:1-3, 1995
343. Lubrano R, Taccone-Gallucci M, Mazzarella V, Bandino D, Citti G, Elli M, Giardini O, Casciani CU: Relationship between red blood cell lipid peroxidation, plasma hemoglobin, and red blood cell osmotic resistance before and after vitamin E supplementation in hemodialysis patients. *Artif Organs* 10:245-248, 1986
344. Roob JM, Khoschorur G, Tiran A, Horina JH, Holzer H, Winklhofer-Roob BM: Vitamin E attenuates oxidative stress induced by intravenous iron in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 11:539-549, 2000
345. Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafter U, Iaina A, Knecht A, Weissgarten Y, Brunner D, Fainaru M, Green MS: Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 356:1213-1218, 2000



346. Mann JF, Lonn EM, Yi Q, Gerstein HC, Hoogwerf BJ, Pogue J, Bosch J, Dagenais GR, Yusuf S: Effects of vitamin E on cardiovascular outcomes in people with mild-to-moderate renal insufficiency: results of the HOPE study. *Kidney Int* 65:1375-1380, 2004
347. Tepel M, van der GM, Statz M, Jankowski J, Zidek W: The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial. *Circulation* 107:992-995, 2003
348. Scholze A, Rinder C, Beige J, Riezler R, Zidek W, Tepel M: Acetylcysteine reduces plasma homocysteine concentration and improves pulse pressure and endothelial function in patients with end-stage renal failure. *Circulation* 109:369-374, 2004
349. Thaha M, Yogiantoro M, Tomino Y: Intravenous N-acetylcysteine during haemodialysis reduces the plasma concentration of homocysteine in patients with end-stage renal disease. *Clin Drug Investig* 26:195-202, 2006
350. Kunz K, Petitjean P, Lisri M, Chantrel F, Koehl C, Wiesel ML, Cazenave JP, Moulin B, Hannedouche TP: Cardiovascular morbidity and endothelial dysfunction in chronic haemodialysis patients: is homocyst(e)ine the missing link? *Nephrol Dial Transplant* 14:1934-1942, 1999
351. Sunder-Plassmann G, Fodinger M, Buchmayer H, Papagiannopoulos M, Wojcik J, Kletzmayer J, Enzenberger B, Janata O, Winkelmayr WC, Paul G, Auinger M, Barnas U, Horl WH: Effect of high dose folic acid therapy on hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients: results of the Vienna multicenter study. *J Am Soc Nephrol* 11:1106-1116, 2000
352. Gonin JM: Folic acid supplementation to prevent adverse events in individuals with chronic kidney disease and end stage renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14:277-281, 2005
353. Chiarello PG, Vannucchi MT, Moyses NM, Vannucchi H: Hyperhomocysteinemia and oxidative stress in hemodialysis: effects of supplementation with folic acid. *Int J Vitam Nutr Res* 73:431-438, 2003

354. Suliman ME, Lindholm B, Barany P, Qureshi AR, Stenvinkel P: Homocysteine-lowering is not a primary target for cardiovascular disease prevention in chronic kidney disease patients. *Semin Dial* 20:523-529, 2007
355. Palleschi S, De Angelis S, Rossi B, Diana L, Papa V, Severini G, Splendiani G: Homocysteinemia correlates with plasma thiol redox status in patients with end-stage renal disease. *Nephron Clin Pract* 108:c106-c112, 2008
356. Vaziri ND: Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol* 24:469-473, 2004
357. Rossert JA, McClellan WM, Roger SD, Verbeelen DL, Horl WH: Contribution of anaemia to progression of renal disease: a debate. *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 1:60-66, 2002
358. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976
359. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191, 1988
360. Ostling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123:291-298, 1984
361. Landray MJ, Thambyrajah J, McGlynn FJ, Joñes HJ, Baigent C, Kendall MJ, Townend JN, Wheeler DC: Epidemiological evaluation of known and suspected cardiovascular risk factors in chronic renal impairment. *Am J Kidney Dis* 38:537-546, 2001
362. Wannamethee SG, Shaper AG, Perry IJ: Serum creatinine concentration and risk of cardiovascular disease: a possible marker for increased risk of stroke. *Stroke* 28:557-563, 1997



363. Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N: Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant* 20:1048-1056, 2005
364. Van Biesen W, De Bacquer D, Verbeke F, Delanghe J, Lameire N, Vanholder R: The glomerular filtration rate in an apparently healthy population and its relation with cardiovascular mortality during 10 years. *Eur Heart J* 28:478-483, 2007
365. Piroddi M, Depunzio I, Calabrese V, Mancuso C, Aisa CM, Binaglia L, Minelli A, Butterfield AD, Galli F: Oxidatively-modified and glycated proteins as candidate pro-inflammatory toxins in uremia and dialysis patients. *Amino Acids* 32:573-592, 2007
366. Balabanli B, Kamisaki Y, Martin E, Murad F: Requirements for heme and thiols for the nonenzymatic modification of nitrotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13136-13141, 1999
367. Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellstrom B: Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 12:2747-2752, 2001
368. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen KT, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drueke T, Descamps-Latscha B: Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 161:2524-2532, 1998
369. Yilmaz MI, Saglam M, Caglar K, Cakir E, Sonmez A, Ozgurtas T, Aydin A, Eyiletan T, Ozcan O, Acikel C, Tasar M, Genctoy G, Erbil K, Vural A, Zoccali C: The determinants of endothelial dysfunction in CKD: oxidative stress and asymmetric dimethylarginine. *Am J Kidney Dis* 47:42-50, 2006
370. Tarng DC, Wen CT, Huang TP, Chen CL, Liu TY, Wei YH: Increased oxidative damage to peripheral blood leukocyte DNA in chronic peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 13:1321-1330, 2002
371. Boulanger E, Moranne O, Wautier MP, Witko-Sarsat V, Descamps-Latscha B, Kandoussi A, Grossin N, Wautier JL: Changes in glycation and oxidation markers in patients starting peritoneal dialysis: a pilot study. *Perit Dial Int* 26:207-212, 2006



372. Taccone-Gallucci M, Giardini O, Lubrano R, Mazzarella V, Bandino D, Khashan S, Mannarino O, Elli M, Cozzari M, Buoncristiani U, .: Red blood cell membrane lipid peroxidation in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Am J Nephrol* 6:92-95, 1986
373. Pastor MC, Sierra C, Bonal J, Teixido J: Serum and erythrocyte tocopherol in uremic patients: effect of hemodialysis versus peritoneal dialysis. *Am J Nephrol* 13:238-243, 1993
374. Girelli D, Lupo A, Trevisan MT, Olivieri O, Bernich P, Zorzan P, Bassi A, Stanzial AM, Ferrari S, Corrocher R: Red blood cell susceptibility to lipid peroxidation, membrane lipid composition, and antioxidant enzymes in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 12:205-210, 1992
375. Nourooz-Zadeh J: Effect of dialysis on oxidative stress in uraemia. *Redox Rep* 4:17-22, 1999
376. Donate T, Herreros A, Martinez E, Martinez J, Andres E, Cabezas A, Ortiz A, de Prado A, Pou JM, Pamplona R, Portero OM, Bellmunt MJ: Protein oxidative stress in dialysis patients. *Adv Perit Dial* 18:15-17, 2002
377. Boulanger E, Moranne O, Wautier MP, Witko-Sarsat V, Descamps-Latscha B, Kandoussi A, Grossin N, Wautier JL: Changes in glycation and oxidation markers in patients starting peritoneal dialysis: a pilot study. *Perit Dial Int* 26:207-212, 2006
378. Lysaght MJ, Vonesh EF, Gotch F, Ibels L, Keen M, Lindholm B, Nolph KD, Pollock CA, Prowant B, Farrell PC: The influence of dialysis treatment modality on the decline of remaining renal function. *ASAIO Trans* 37:598-604, 1991
379. Michelis R, Gery R, Sela S, Shurtz-Swirski R, Grinberg N, Snitkovski T, Shasha SM, Kristal B: Carbonyl stress induced by intravenous iron during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 18:924-930, 2003
380. Panayiotidis M, Tsolas O, Galaris D: Glucose oxidase-produced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces Ca<sup>2+</sup>-dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Free Radic Biol Med* 26:548-556, 1999



381. Matas AJ, Simmons RL, Kjellstrand CM, Buselmeier TJ, Najarian JS: Increased incidence of malignancy during chronic renal failure. *Lancet* 1:883-886, 1975
382. Giacchino F, Pozzato M, Formica M, Pellerey M, Quattrocchio G, Comune L, Berto M, Piccoli G: [Neoplasms in chronic kidney failure]. *Minerva Nefrol* 30:33-35, 1983
383. Maisonneuve P, Agodoa L, Gellert R, Stewart JH, Buccianti G, Lowenfels AB, Wolfe RA, Jones E, Disney AP, Briggs D, McCredie M, Boyle P: Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. *Lancet* 354:93-99, 1999
384. Iseki K, Osawa A, Fukiyama K: Evidence for increased cancer deaths in chronic dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 22:308-313, 1993
385. Marple JT, MacDougall M: Development of malignancy in the end-stage renal disease patient. *Semin Nephrol* 13:306-314, 1993
386. Tarng DC, Huang TP, Wei YH, Liu TY, Chen HW, Wen CT, Yang WC: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine of leukocyte DNA as a marker of oxidative stress in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 36:934-944, 2000
387. 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* 38:296-301, 2001