

# APARATURA

## BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

### Wpływ wód siarczkowo-siarkowodorowych z okolic Buska-Zdroju na stężenie glutationu we krwi pełnej analizowanej metodą elektroforezy kapilarnej

EWELINA BŁOŃSKA-SIKORA, JERZY OSZCZUDŁOWSKI, ZYGFRYD WITKIEWICZ, DARIUSZ WIDĘŁ  
UNIwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy,  
Instytut Chemii

**Słowa kluczowe:** wody siarczkowo-siarkowodorowe, siarkowódór, krenoterapia, glutation, elektroforeza kapilarna

#### STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy było określenie, czy krenoterapia (kuracja pitna) za pomocą wód siarczkowo-siarkowodorowych słonych (WSSS) pochodzących z ujęcia „Zuzanna” z okolic Buska-Zdroju ma wpływ na zmianę stężenia glutationu (GSH i GSSG) we krwi pełnej. WSSS zawierają nie mniej niż 1 g związków siarki ogólnej w kilogramie wody leczniczej, a ich działanie zależy nie tylko od zawartości związków siarki, ale także od rodzaju i zawartości innych biopierwiastków. Liczne badania potwierdzają korzystny wpływ  $H_2S$  na parametry antyoksydacyjne organizmu. W analizie stężenia GSH i GSSG we krwi wykorzystano metodę elektroforezy kapilarnej z detektorem UV. Badaniu poddano grupę 40 ochotników, zarówno kobiet jak i mężczyzn, w różnych przedziałach wiekowych. Kuracja za pomocą WSSS trwała 2 tygodnie. Otrzymane wyniki badań potwierdzają, że  $H_2S$  występujący w WSSS zwiększa stężenie glutationu we krwi, a także dają uzasadnienie dla wykorzystywania krenoterapii w lecznictwie.

#### Analyzing the influence of sulfide/hydrogen sulfide waters from the region of Busko-Zdrój on the concentration of glutathione in whole blood by capillary electrophoresis

**Keywords:** sulfide/hydrogen sulfide waters, hydrogen sulfide, crenotherapy, glutathione, capillary electrophoresis

#### ABSTRACT

The objective of the study was to agree whether crenotherapy (drinking therapy) with sulfide/hydrogen sulfide (SHS) waters from “Zuzanna” spring located in the area of Busko-Zdrój leads to increasing of glutathione (GSH and GSSG) content in human blood. SHS waters contain at least 1 g of total sulfur per kilogram of water and a treatment effect also depends on other bioelements. A lot of earlier experiments confirmed positive influence of  $H_2S$  on antioxidative properties of organism. The method employing capillary electrophoresis with UV detector for the analysis of glutathione in human blood was developed. The group of 40 volunteers consisted of both women and men, in different age range. The therapy with SHS waters lasted 2 weeks. We recently demonstrated that the administration of  $H_2S$  in SHS waters increases GSH concentration in blood, and therefore crenotherapy could be used in therapeutics.

## 1. WSTĘP

Krenoterapia jest jednym z elementów balneoterapii, czyli metody leczenia wykorzystującej wody lecznicze, gazy, peloidy [1]. Krenoterapia, czyli kuracja pitna, to proces leczenia z użyciem wód o szczególnych właściwościach leczniczych, polegający na picciu wód przez określony czas, w ściśle określonej ilości, temperaturze i czasie w stosunku do spożywanych posiłków, zgodnie z zaleceniami lekarskimi. Największą wartość mają wody mineralne pobierane bezpośrednio ze źródła, ale duże znaczenie ma także leczenie pozauzdrowiskowe wodami mineralnymi magazynowanymi w butelkach [2].

W niniejszej pracy użyto WSSS pochodzących z ujęcia „Zuzanna” z okolic Buska-Zdroju. W reumatologii wody siarczkowo-siarkowodorowe znajdują zastosowanie w leczeniu: choroby zwyrodnieniowej stawów obwodowych i kręgosłupa, zesztywniającego zapalenia stawów kręgosłupa, łuszczycowego zapalenia stawów, reumatoidalnego zapalenia stawów, dny moczanowej, entezopatii i innych chorób układu mięśniowo-więzadłowego, stanów pourazowych i pooperacyjnych układu ruchu [3-5].

Rolą niniejszego badania jest określenie, czy krenoterapia za pomocą wód siarczkowo-siarkowodorowych słonych (WSSS) ma wpływ na wzrost stężenia glutationu we krwi. Podstawą do przyjęcia takiej tezy były liczne badania potwierdzające wpływ  $H_2S$  na parametry antyoksydacyjne organizmu [6-12]. WSSS zawierają nie mniej niż 1 g związków siarki ogólnej w kilogramie wody leczniczej, a ich działanie zależy nie tylko od zawartości związków siarki, ale także od rodzaju i zawartości innych biopierwiastków [13]. Siarka z WSSS występuje głównie w postaci siarkowodoru i ten gaz jest odpowiedzialny za farmakologiczne działanie wody na organizm i wpływ na stężenie GSH i GSSG. Wody lecznicze w odróżnieniu od wód mineralnych charakteryzują się specyficznymi właściwościami farmakodynamicznymi. Cechuje je stały skład chemiczny i naturalna czystość mikrobiologiczna [6].

W analizie stężenia glutationu w organizmie ludzkim stosuje się różne metody chromatograficzne takie jak: chromatografia cieczowa z detektorem elektrochemicznym [14], UV [15], fluorymetrycznym [16-18], spektrometrem mas [19], chromatografię gazową ze spektrometrią mas [20]. W ostatnim czasie wzrosło znaczenie elektrofo-

rezy kapilarnej jako narzędzia służącego do analizy związków tiolowych [21-23]. Zaletą tej techniki analitycznej jest niewielkie zużycie buforów i rozpuszczalników, szybki rozdział i mała objętość próbki.

Stężenie glutationu w organizmie człowieka określa się głównie na podstawie analizy osocza, erytrocytów lub krwi pełnej, ponieważ stężenie w tych strukturach organizmu najpełniej odzwierciedla stężenie GSH i GSSG w całym organizmie. W niniejszym badaniu stężenie GSH i GSSG analizowano we krwi pełnej.

Artykuł opisuje procedurę analityczną oznaczania GSH i GSSG we krwi pełnej, oraz prezentuje otrzymane wyniki wraz z ich interpretacją fizyczną. Uzyskane dotychczas wyniki dają nadzieję na korzystanie z balneoterapii, czyli leczenia za pomocą substancji naturalnych (takich jak m.in. wody lecznicze), które wpływa na poprawę zdrowia poprzez wzrost ilości glutationu w organizmie. Wzrost stężenia GSH jest parametrem poprawy stanu zdrowia pacjentów biorących udział w eksperymencie, poprzez poprawę funkcjonowania układu immunologicznego i wpływ na właściwości antyoksydacyjne. Badaniu poddano również subiektywne samopoczucie pacjentów poddanych kuracji.

## 2. ZAGADNIENIA TEORETYCZNE

### 2.1 Rola glutationu w organizmie człowieka

Glutation występuje w organizmie w kilku formach, z których najważniejsze stanowią formy: zredukowana (GSH) i utleniona (GSSG), odgrywające główną rolę w utrzymaniu równowagi antyoksydacyjnej organizmu. Charakterystycznym elementem budowy glutationu jest grupa tiolowa (-SH), z którą wiążą się bezpośrednio jego biologiczne funkcje. Chroni organizm przed działaniem substancji utleniających, do których należą m.in. reaktywne formy tlenu (nadtlenek wodoru, nadtlenki organiczne), egzo- i endogenne związki elektrofilowe, a także utlenione formy innych przeciwutleniaczy np. witaminy C i E. Cząsteczka glutationu wchodzi również w skład specyficznego selenoenzymu – peroksydazy glutationowej, pełniącej funkcję najważniejszego reduktora nadtlenku wodoru i nadtlenków lipidów. Funkcją glutationu związaną z działaniem przeciwutleniającym jest także utrzymywanie grup tiolowych aminokwasów w stanie zredukowanym, co zapobiega ich nieodwracalnemu utlenieniu do kwasów sul-

fonowych i sulfinowych oraz utracie właściwości biologicznych białka [24, 25].

GSH odgrywa również istotną rolę w regulacji działania układu immunologicznego. Wpływa na produkcję cytokin i rodzaj odpowiedzi komórkowej i humoralnej poprzez modulowanie prezentacji antygenów limfocytom [26]. Odgrywa ważną rolę w proliferacji limfocytów i komórek NK (natural killers). Okazuje się, że nawet niewielkie zaburzenia stężenia granulocytów w limfocytach mogą upośledzać ich funkcje [27, 28].

Duże znaczenie GSH podkreśla fakt, że syntetyzuje go każda komórka organizmu, ponieważ niezbędne jest ciągłe pokrywanie wysokiego zapotrzebowania na ten związek. Gdyby nie glutation, organizm nie mógłby się bronić przed zakażeniami i rozwojem nowotworów, wątroba nie miałaby zdolności detoksykacji metali ciężkich, toksyn i ksenobiotyków, a komórki ulegałyby nieustającemu niszczeniu. Mimo iż wpływ glutationu na różne procesy fizjologiczne jest powszechnie znany, to wciąż brak konkretnych doniesień dotyczących skuteczności suplementacji tą substancją.

Jako modulatory stężenia glutationu stosuje się m.in. estry glutationu [29-31], aminokwasy (cysteina, glutamina), ich pochodne (S-adenozylmetionina [32-33], N-acetylocysteina [34-35], a także wiele innych związków takich jak: witamina C [36-38], E [39-40], D<sub>3</sub> [41], sylimaryna [42, 43], kwas alfa-liponowy [44-47], melatonina [48], białka serwatkowe [49-52].

## **2. 2 Wpływ siarkowodoru na stężenie glutationu i parametry antyoksydacyjne organizmu**

Udział H<sub>2</sub>S w ważnych procesach życiowych nie powinien budzić zdziwienia, gdyż jedne z pierwszych żywych organizmów na ziemi, sinice, wykorzystują go do fotosyntezy w warunkach beztlenowych [3]. Jest słabym kwasem i w organizmie człowieka przy pH 7,4 występuje w jednej trzeciej w postaci H<sub>2</sub>S, a w dwóch trzecich w postaci H<sup>+</sup> i HS<sup>-</sup>. Nie wiadomo, czy biologiczna rola tego gazu zależy od H<sub>2</sub>S, czy od kombinacji obu tych form [53]. In vivo jest wytwarzany z aminokwasów: l-cysteiny, l-homocysteiny, l-cystationiny [54-56]. Już pod koniec lat 80. XX wieku zaobserwowano w mózgu stosunkowo wysokie stężenie H<sub>2</sub>S. Aktywuje on kanały wapniowe w astrocytach [7], zwiększa aktywność receptorów NMDA w mózgu wpływając na przewodnictwo synaptyczne, odpowiedzialne prawdopodobnie za proces uczenia się [53, 54]. Siarkowodor jest modulatorem

aktywności synaps zarówno w neuronach jak i w gleju [8], chroni komórki śródbłonna przed stresem oksydacyjnym, który indukuje wytwarzanie wolnych rodników w naczyniach mózgowych [9], zwiększa antyoksydacyjne działanie NAC, GSH, katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej, estru metylowego - N nitro - L-argininy, zwiększa transport cysteiny i cystyny [7, 10].

Kimura [10] przedstawił neuroprotektoryjne działanie siarkowodoru podawanego w postaci NaHS na kulturę neuronów pobranych od szczurów. H<sub>2</sub>S chronił neurony hipokampa przed toksycznym wpływem glutaminianu poprzez zwiększenie poziomu endogennego glutationu.

Drugą ważną funkcją H<sub>2</sub>S jest jego wpływ na układ krążenia. Badania przeprowadzone w ostatnich latach potwierdzają, że H<sub>2</sub>S jest gazowym, nieorganicznym mediatorem regulującym funkcje układu krążenia obok wcześniej znanych gazów: NO i CO [57]. Badania kliniczne wskazują, że zarówno endogenne jak i egzogenne H<sub>2</sub>S pełni ważną funkcję w regulacji ciśnienia tętniczego [26, 58, 59], rozszerza naczynia, hamuje kurczliwość mięśnia sercowego i proliferację komórek mięśniówki naczyni [26].

Oprócz działania na układ krążenia i neurony siarkowodor pełni w organizmie wiele innych funkcji m.in.: wpływa na bodźce bólowe, reguluje wydzielanie insuliny w trzustce [60-64], działa cytoprotekcyjnie na komórki wątroby [65], chroni jelito grube [66, 67]. H<sub>2</sub>S chroni również komórki β trzustki narażone na chroniczną ekspozycję na wysokie stężenie glukozy przed śmiercią wywołaną apatozą.

H<sub>2</sub>S pełni ważną rolę w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS). Maż stawowa pobrana od osób z RZS zawiera 4 razy więcej H<sub>2</sub>S niż osocze, natomiast u osób zdrowych 2 razy więcej niż osocze. Przeprowadzone in vivo i in vitro badania sugerują, że siarkowodor bierze udział w mechanizmie kontroli, ograniczania i odwracania stanu zapalnego [68]. Przeciwwzapalne działanie siarkowodoru polega na hamowaniu enzymów odpowiedzialnych za powstawanie czynników prozapalnych. H<sub>2</sub>S neutralizuje również bezpośrednio anion ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru i nadtlenki azotu w stawach [69].

Wożakowska-Kapłon i wsp. [6] badali wpływ oddziaływania WSSS na aktywność jednego z enzymów antyoksydacyjnych w krwinkach czerwonych – katalazy (CAT) u chorych na RZS w modelu in vitro. W krwinkach czerwonych u chorych na

RZS zaobserwowano większą aktywność CAT niż w grupie kontrolnej. Inkubacja krwinek w WSSS in vitro korzystnie modyfikuje wskaźniki metabolizmu tlenowego krwinek czerwonych u chorych na RZS, czego wyrazem jest tendencja wzrostowa aktywności CAT krwinek czerwonych w początkowym okresie inkubacji.

Grabski i wsp. [12] badali wpływ WSSS na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach pacjentów z RZS. Zawarty w wodzie siarkowodor powodował znaczącą poprawę aktywności enzymu, co świadczy o antyoksydacyjnych właściwościach WSSS.

### 3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

#### 3.1 Grupa badana

Badaniu poddano grupę 40 ochotników, 29 kobiet i 11 mężczyzn w wieku od 25 do 82 lat. W tej grupie znalazły się osoby zdrowe jak i cierpiące na różnego rodzaju schorzenia przewlekłe, związane ze stresem oksydacyjnym, np. RZS i inne schorzenia reumatyczne. U żadnego z ochotników nie stwierdzono przeciwwskazań do stosowania kuracji. Wszyscy ochotnicy zostali poinformowani o celu badań i na udział w nich wyrazili pisemną zgodę. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy wydziale Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach nr 26/2011 z dn. 18.03.2011.

Podczas kuracji ochotnicy nie przyjmowali żadnych dodatkowych substancji leczniczych mogących modyfikować stężenie glutationu, z wyjątkiem leków stosowanych stale w leczeniu np. nadciśnienia tętniczego lub chorób serca. Ochotnicy podczas kuracji nie przechodzili również żadnych chorób związanych z obniżeniem odporności i stosowali normalną dietę. Kuracja za pomocą WSSS trwała 2 tygodnie, podczas których ochotnicy przyjmowali 3 razy dziennie po 50 ml wody na czczo, 30 min. przed każdym głównym posiłkiem. Krew użyta do analizy stężenia glutationu została pobrana dwukrotnie od każdej z osób przed kuracją i po jej zakończeniu. Krew pobierano rano, na czczo z naczynia żylnego w okolicy zgięcia łokciowego w Poradni Chemioterapii Diennej Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach.

#### 3.2 Odczynniki

Do ilościowego oznaczania GSH i GSSG w ludzkiej krwi metodą elektroforezy kapilarnej użyto odczynników zawartych w zestawie „CEofix™, GSH

KIT” firmy Analis z Belgii. Zestaw zawierał między innymi kondycjoner – 0,1M NaOH; akcelerator – dodecylsulfian sodowy (SDS)/bufor boranowy o pH = 8,2 ± 0,2; inicjator – bufor boranowy o pH = 9,2 ± 0,2; roztwór do rozcieńczania próbek – kwas naftalenosulfonowy oraz wodę redetylowaną. Ponadto zaopatrzone się w kwas metafosforowy (MPA) z firmy Fluka. Wzorcowe glutationu w postaci GSH i GSSG zakupiono w firmie Sigma Aldrich.

#### 3.3 Aparatura i warunki analizy

Do oznaczania glutationu użyto aparatury do elektroforezy kapilarnej P/ACE MDQ Capillary-Electrophoresis System firmy BeckmanCoulter z USA. Zastosowano kapilarę o długości efektywnej, czyli od początku do okna detekcji, 30 cm i średnicy wewnętrznej 75 μm. Użyto detektora UV ustawionego na długość fali 200 nm. Temperatura kartridża oraz przechowywania próbek wewnątrz aparatu wynosiła 25°C.

#### 3.4 Przygotowanie roztworów podstawowych i roboczych

W celu przygotowania roztworu podstawowego GSH odważono na wadze analitycznej 24,6 mg wzorca glutationu zredukowanego i rozcieńczono wodą do 50 g. Następnie odważono 12,3 mg wzorca GSSG i rozcieńczono wodą do 50 g. Roztwór kwasu metafosforowego o stężeniu 5% przygotowywano codziennie świeży przez rozpuszczanie stałego kwasu w wodzie.

Do wyznaczenia funkcji kalibracyjnej przygotowano pięć roztworów roboczych o różnych stężeniach GSH i GSSG. Roztwory przygotowywano przez mieszanie różnych ilości roztworów podstawowych GSH i GSSG z 5% kwasem metafosforowym, a następnie rozcieńczano wodą. Ilości odczynników do przygotowania roztworów roboczych oraz uzyskane stężenia GSH i GSSG w tych roztworach przedstawiono w tabeli 1. Roztwory robocze przechowywano w szczelnie zamkniętych probówkach typu eppendorf w temperaturze -20 °C, do czasu analizy, która odbyła się tego samego dnia.

#### 3.5 Metoda przygotowania próbki rzeczywistej

Jeden mililitr krwi żyłnej umieszczono niezwłocznie po pobraniu w probówkach z EDTA, po czym delikatnie ją wymieszano, potrząsając probówką w górę i w dół w celu ujednoczenia próbki. Z tej ilości pobrano następnie 200 μl do probówek

**Tabela 1** Ilości odczynników do przygotowania roztworów roboczych oraz uzyskane stężenia końcowe GSH i GSSG

**Table 1** The quantities of reagents for the preparation of working solutions and final concentrations of GSH and GSSG

Poziom	MPA 5% [ml]	R. podst. GSH [μl]	R. podst. GSSG [μl]	Woda [μl]	Stęż. GSH [μM]	Stęż. GSSG [μM]
1	7,5	1000	1000	500	40	10
2	7,5	750	500	1250	30	5
3	7,5	500	100	1900	20	1
4	7,5	250	250	2000	10	2,5
5	7,5	125	2000	375	5	20

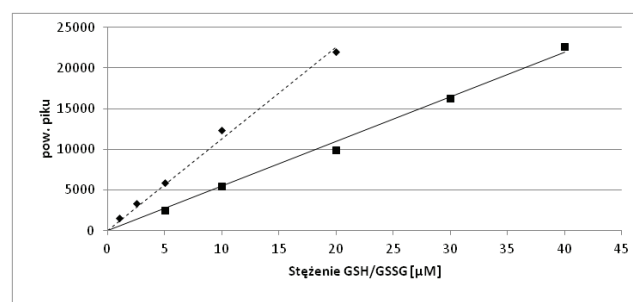
przystosowanych do wirówki o pojemności 1,5 ml i niezwłocznie dodano 600 μl 5% kwasu metafosforowego w celu odbiałczenia krwi. Kwas przygotowywano codziennie bezpośrednio przed analizą. Probówki umieszczono natychmiast w pokruszonym lodzie w celu schłodzenia próbek. Tak przygotowaną mieszaninę krwi i kwasu wytrząsano przez 15 sek. w wytrząsarce, a następnie odwirowano w termostatowanej wirówce z prędkością 4000 obr/min. w temp. 4°C. Po odwirowaniu pobrano dwa razy po 200 μl supernatantu do szczelnie zamykanych probówek uniemożliwiających dostęp powietrza, po czym probówki niezwłocznie zamrożono w temperaturze -80°C. Próbkę przechowywano w temperaturze -20°C do czasu analizy, która odbyła się tego samego dnia.

### 3.6 Przebieg analizy

Po zainstalowaniu kapilary w aparacie przystąpiono do jej kondycjonowania poprzez przemywanie jej kolejno wodą, inicjatorem i akceleratorem, każdą substancją dwukrotnie, najpierw pod ciśnieniem 20 psi przez 1 min, a następnie pod ciśnieniem 0,5 psi przez 4 min. Po wykondycjonowaniu kapilary przystąpiono do analizy pięciu roztworów roboczych. Stosowano dozowanie próbki pod ciśnieniem 0,2 psi przez 8 sek., a następnie dozowano wodę pod ciśnieniem 0,1 psi przez 10 sekund (w celu przepchnięcia próbki w głąb kapilary). Rozdzielanie prowadzono pod napięciem 6 kV przez 9,5 minuty w temperaturze 25°C przy normalnej polaryzacji elektrod.

### 3.7 Kalibracja

Po wykonaniu analiz pięciu roztworów roboczych (każdy pięć razy) wyznaczono funkcję kalibracyjną metodą wzorca zewnętrznego. Współczynnik regresji liniowej zarówno dla GSH jak i dla GSSG wynosił 0,993 (Rys. 1).

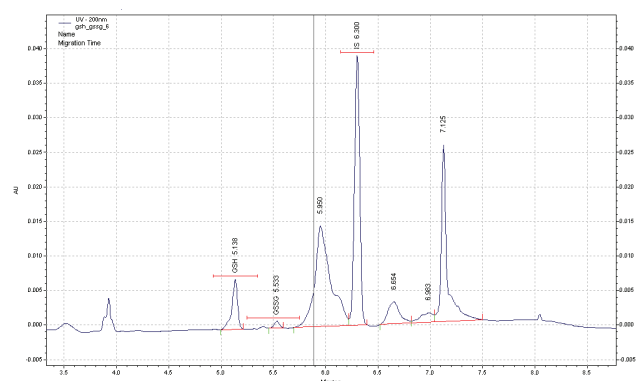


**Rysunek 1** Krzywa kalibracyjna GSH/GSSG wyznaczona metodą wzorca zewnętrznego:

----- GSSG,  
 ..... GSH,

**Figure 1** Calibration curve of GSH/GSSG determined by external standard method:

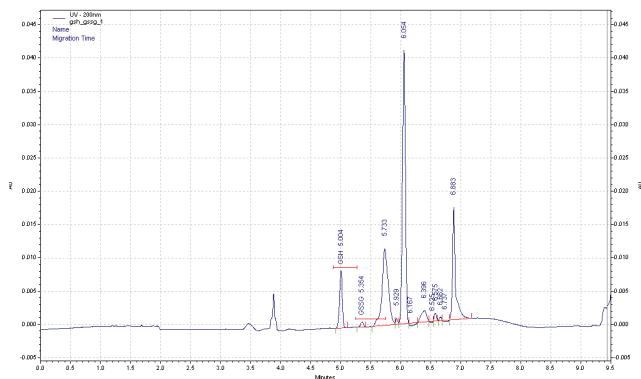
----- GSSG,  
 ..... GSH,



**Rysunek 2** Elektroforegram wybranego roztworu roboczego GSH/GSSG

**Figure 2** Electropherogram of selected working solution of GSH/GSSG

Jako wzorec wewnętrzny umożliwiający identyfikację GSH i GSSG zastosowano kwas naftaleno-sulfonowy oznaczony jako IS.



**Rysunek 3** Elektroforegram wybranej próbki krwi  
**Figure 3** Electropherogram of selected blood sample

**Tabela 2** Stężenie GSH i GSSG we krwi pełnej ochotników przed i po kuracji za pomocą WSSS  
**Table 2** The concentration of GSH and GSSG in whole blood of volunteers before and after treatment with WSSS

Kobiety					
Przed kuracją				Po kuracji	
L. p.	Wiek	GSH [μM/l]	GSSG [μM/l]	GSH [μM/l]	GSSG [μM/l]
1.	80	992,00	44,44	1000,06	101,47
2.	49	1011,57	46,98	929,9	39,66
3.	28	1306,55	26,38	1977,21	31,36
4.	57	951,27	77,59	979,37	56,97
5.	77	787,18	47,46	904,26	42,77
6.	25	873,1	28,82	922,82	18,22
7.	47	669,53	25,5	1120,34	46,14
8.	56	1046,85	57,28	1049,03	24,84
9.	55	967,83	46,25	981,70	51,91
10.	46	974,26	56,96	992,09	27,95
11.	46	957,34	73,15	958,53	77,52
12.	75	999,57	27,86	756,40	83,15
13.	37	1191,71	71,41	1197,97	64,55
14.	33	1098,79	32,99	1100,53	50,04
15.	54	1118,18	52,68	1149,92	22,95
16.	39	711,5	34,8	779,94	37,78
17.	78	1083,97	36,94	1031,49	44,28
18.	57	1037,05	40,23	1051,43	56,58
19.	57	1243,98	51,56	1283,42	42,31

20.	52	975,78	41,45	1006,80	47,77
21.	82	782,33	46,57	909,22	43,24
22.	77	781,56	46,78	896,32	41,43
23.	56	981,59	80,3	993,14	60,26
24.	35	1018,02	49,44	911,07	38,38
25.	57	948,47	77,91	985,41	60,26
26.	56	923,74	74,56	959,55	52,42
27.	76	797,65	49,04	896,32	41,43
28.	53	1089,71	37,99	1205,67	54,27
29.	49	946,29	33,75	1009,88	43,8
Min.		711,5	25,5	756,4	18,22
Max.		1306,55	77,91	1970,33	101,47

#### Mężczyźni

Przed kuracją		Po kuracji			
L. p.	Wiek	GSH [μM/l]	GSSG [μM/l]	GSH [μM/l]	GSSG [μM/l]
1.	54	1072,68	35,95	1226,37	55,80
2.	50	1089,02	36,04	1226,81	56,10
3.	29	1311,53	65,6	1470,51	56,21
4.	26	1001,82	49,56	1028,01	106,70
5.	31	1410,89	25,06	1415,36	25,93
6.	29	1315,27	63,99	1484,18	53,32
7.	49	1104,67	34,19	1120,34	46,14
8.	58	1089,67	55,54	1210,39	48,93
9.	56	1317,19	23,9	1369,60	41,96
10.	54	1314,87	67,27	1459,70	56,26
11.	56	1019,11	59,57	1028,37	29,77
Min.		1001,82	23,9	1028,01	25,93
Max.		1410,89	65,6	1459,70	106,7

#### 4. WNIOSKI

W ilościowym oznaczaniu GSH i GSSG we krwi pełnej zastosowano metodę elektroforezy kapilarnej. Opracowano skuteczną metodę przygotowania próbek krwi, w tym metodę precypitacji białek, a także warunki analizy elektroforetycznej. Metoda oznaczania GSH i GSSG została użyta do oceny

poziomu tych związków u ochotników poddanych dwutygodniowej kuracji za pomocą WSSS. Stwierdzono wzrost poziomu GSH u 36 z 40 osób, co daje podstawę do dalszych badań. WSSS mogą-

matyczne, szczególnie w przypadkach, gdy farmakologiczne leczenie jest przeciwwskazane, lub wywołuje silne skutki uboczne.

## LITERATURA

- [1] Happach M., *Nowa Medycyna* 12 (1999).
- [2] Jędrzejczak M., Sowa I., Kocjan R., *Bromat. Chem. Toksykol.* 40, 167-172, (2007).
- [3] Legwant Z., *Balneologia Polska* 36 (1995).
- [4] Smolarczyk M., *Problemy Uzdrowiskowe* (5), 28, (1985).
- [5] Kimura H., *Antioxid. Redox Signal.* (12), 9, 1111-23, (2010).
- [6] Wożakowska-Kapłon B., Grabski M., Kędzióra J., *Wiadomości Lekarskie* (1-2), 59, 72-76, (2006).
- [7] Kimura Y., Kimura H., *The Faseb Journal* 18, 1165-67, (2004).
- [8] Kimura H., Nagai Y., Umemura K., Kimura Y., *Antioxid. Redox Signal.* (7), 5-6, 795-803, (2005).
- [9] Tyagi N., Moshal K. S., Sen U., Vacek T. P., Kumar M., Hughes W. M., Kundu S., Tyagi S. C., *Antioxid. Redox Signal.* (11), 1, 25-33, (2009).
- [10] Kimura Y., Goto Y., Kimura H., *Antioxid. Redox Signal.* (12), 1, 1-13, (2010).
- [11] Kida K., Yamada M., Tokuda K., Marutani E., Kakinohana M., Kaneki M., Ichinose F., *Antioxid. Redox Signal.* (15), 2, 343-52, (2011).
- [12] Grabski M., Wożakowska-Kapłon B., Kędzióra J., *Przegl. Lek.* (61), 12, 1405-9 (2004).
- [13] Jankowiak J., *Balneologia Kliniczna*, PZWL, Warszawa 1973.
- [14] Hiraku Y., Murata M., Kawanishi S., *Biochim. Biophys. Acta* (1570), 1, 47-52, (2002).
- [15] Lazzarino G., Amorini A. M., Fazzina G., Vagnozzi R., Signoretti S., Donzelli S., Di Stasio E., Giardina B., Tavazzi B., *Anal. Biochem.* 322, 51-59, (2003).
- [16] Lenton K. J., Therriault H., Wagner J. R., *Anal. Biochem.* 274, 125-130, (1999).
- [17] Fukunaga K., Nakazono N., Yoshida M., *Chromatographia* 48, 690-694, (1998).
- [18] Abukhalaf I. K., Silvestrov N. A., Menter J. M., Silvestrov N. A., Menter J. M., Von Deutsch D. A., Bayorh M. A., Socci R. R., Ganafa A. A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 637-43, (2002).
- [19] Guan X., Hoffman B., Dwivedi C., Matthees D. P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* (31), 2, 251-61, (2003).
- [20] Whiteman M., Li L., Rose P., Tan Ch., Parkinson D. B., Moore P. K., *Antioxid. Redox Signal.* (12), 10, 1147-54, (2010).
- [21] Zunica G., Spasic S., *J. Chromatogr. B.* 873, 70-76, (2008).
- [22] Serru V., Baudin B., Ziegler F., David J. P., Cals M. J., Vaubourdolle M., *Clin. Chem.* (47), 7, 1321-24, (2001).
- [23] Wang W., Xin H., Shao H., Jin W., *J. Chromatogr. B.* 789, 425-429, (2003).
- [24] Bukowska B., *Medycyna Pracy* (55), 6, 501-509, (2004).
- [25] Biłska A., Kryczyk A., Włodek L., *Postępy Hig. Med. Dośw.* 61, 438-453, (2007).
- [26] Bełtowski J., *Postępy Hig. Med. Dośw.* 58, 285-291, (2004).
- [27] Wu G., Fang Y., Yang S., Lupton J. R., Turner N. D., *J. Nutr.* 134, 489-492, (2004).
- [28] Han D., Handelman G., Marcocci L., Sen C. K., Roy S., Kobuchi H., Tritschler H. J., Flohé L., Packer L., *Bio Factors.* (6), 3, 321-338, (1997).
- [29] Lenton K. J., Sané A. T., Therriault H., Cantin A. M., Payette H., Wagner J. R., *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 89-95, (2003).
- [30] Meister A., *J. Biol. Chem.* 269, 9397-400, (1994).
- [31] Badaloo A., Reid M., Forrester T., Heird W. C., Jahoor F., *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 646-52, (2002).
- [32] Kojima S., Nakayama K., Ishida H., *J. Radiat. Res.* 45, 33-39, (2004).
- [33] Exner R., Wessner B., Manhart N., Roth E., *Wien Klin. Wochenschr.* 112, 610-6, (2000).

- [34] Roth E., *J. Nutr.* 138, 2025-31, (2008).
- [35] Witschi A., Reddy S., Stofer B., Lauterburg B. H., *European J. Clinical Pharmacol.* 43, 667-9, (1992).
- [36] Henning S. M., Zhang J. Z., Mckee R. W., Swendseid M. E., Jacob A. A., *J. Nutr.* 121, 1969-1975, (1991).
- [37] Lenton K. J., Sané A. T., Therriault H., Cantin A. M., Payette H., Wagner J. R., *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 189-95, (2003).
- [38] Meister A., *J. Biol. Chem.* 269, 9397-400, (1994).
- [39] Jain S. K., McVie R., Smith T., *J. Andrology.* 26, 1389-94, (2005).
- [40] Mansour H. H., Hafez H. F., Fahmy N. M., *Biochem. Pharmacol.* (75), 3, 773-80, (2008).
- [41] Garcion E., Wionbarbot N., Monteromenei C., Berger F., Wion D., *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 13, 100-5, (2002).
- [42] Soto C., Recoba R., Barron H., Alvarez C., Favari L., *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 136, 205-212, (2003).
- [43] Muriel P., Garcapiña T., Perez-Alvarez V., Mourelle M., *J. Applied Toxicol.* 12, 439-442, (1992).
- [44] Shay K., Moreau R., *Biochem. Biophys. Acta*, 1790, 149-60, (2009).
- [45] Biewenga G. P., Haenen G. R., A. Bast. *Gen. Pharmacol.* 29, 315-331, (1997).
- [46] Bilska A., Włodek L., *Pharmacol. Rep.* 57, 570-77, (2005).
- [47] Malińska D., Winiarska K., *Post. Hig. Med. Dośw.* 59, 535-43, (2005).
- [48] Gitto E., Tan D., Reiter J., Karbownik M., Manchester L. C., Cuzzocrea S., Fulia F., Barberi I., *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 1393-1401, (2001).
- [49] Micke P., Beeh K. M., Schlaak J. F., Buhl R., *Eur. J. lin. Invest.* 31, 171-8, (2001).
- [50] Moreno Y. F., Sgarbieri V. C., *J. Trop. Pediatr.* 52, 34-38, (2006).
- [51] Micke P., Beeh K. M., *Eur. J. Nutr.* 41, 12-18, (2002).
- [52] Kent K. D., Harper W. J., Bomser J. A., *Toxicology in Vitro*, 17, 27-33, (2003).
- [53] Kimura H., *Mol. Neurobiol.* (26), 1, 13-9, (2002).
- [54] Bhatia M., Wong F. L., Fu D., Lau H. Y., Moochhala S. M., Moore P. K., *Faseb J.* 19, 623-25, (2005).
- [55] Whiteman M., Moore P. K., *J. Cell. Mol. Med.* 13, 488-507, (2009).
- [56] Whiteman M., Winyard P. G., *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* (4), 1, 13-32, (2011).
- [57] Wang R., *Faseb J.* (16), 13, 1792-98, (2002).
- [58] Yang G., Wu L., Jiang B., Yang W., Qi J., Cao K., Meng Q., Mustafa A. K., Mu W., Zhang S., Snyder S. H., Wang R., *Science* (24), 322, 587-90, (2008).
- [59] Yan H., Du J., Tang C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 22-7, (2004).
- [60] Ali M. Y., Whiteman M., Low C. M., Moore K. P., *J. Endocrinol.* 195, 105-112, (2007).
- [61] Yang W., Yang G., Jia X., Wu L., Wand R. J., *Physiol.* (596), 2, 519-31, (2005).
- [62] Taniguchi S., Niki I., *J. Pharmacol. Sci.* (116), 1, 1-5, (2011).
- [63] Kaneko Y., Kimura T., Taniguchi S., Souma M., Kojima Y., Kimura Y., Kimura H., Niki I., *FEBS Lett.* (583), 2, 377-82, (2009).
- [64] Jain S. K., Bull R., Rains J. L., Bass P. F., Levine S. N., Reddy S., McVie R., Bocchini J. A. Jr., *Antioxid. Redox Signal.* (12), 11, 1333-37, (2010).
- [65] Calvert J. W., Coetzee W. A., Lefer D. J., *Antioxid. Redox Signal.* (12), 10, 1203-17, (2010).
- [66] Pouokam E., Diener M., *British J. Pharm.* 162, 392-404, (2011).
- [67] Hennig B., Diener M., *British J. Pharm.* 158, 1263-75, (2009).
- [68] Whiteman M., Haigh R., Tarr J. M., Gooding K. M., Shore A. C., Winyard P. G., *Ann. NY Acad. Sci.* 1203, 146-150, (2010).
- [69] Yang C., Yang Z., Zhang M., Wang X., Lan A., Zeng F., Chen P., Wang Ch., Feng J., *PLoS ONE* (6), 7, (2011).